

ANNALES DE L'INSTITUT PASTEUR

DIGESTION DE LA CELLULOSE PAR LA FLORE INTESTINALE DE L'HOMME

B. Cellulosæ dissolvens, n. sp.

par M^{me} Y. KHOUVINE.

(Travail des laboratoires de M. le Dr Weinberg et de M. le Pr G. Bertrand.)

INTRODUCTION

Depuis longtemps on sait que la cellulose ingérée disparaît en partie dans le tube digestif de l'homme et des animaux. Dès 1855, Haubner avait montré que les bœufs en digèrent 60 p. 100 environ et les travaux récents de Rubner ont prouvé que le coefficient de digestibilité peut atteindre, chez l'homme, 90 p. 100 (1). Mais on ne savait s'il fallait chercher la cause de cette dissolution dans l'action des sucs intestinaux et stomacaux, voire même de la salive, ou dans celles des fermentations microbiennes. Ce n'est qu'au cours de ces dix dernières années qu'on a fait la preuve que les ferments digestifs n'agissent aucunement sur la cellulose dont les herbivores

(1) Un exposé détaillé des travaux concernant la digestion de la cellulose ainsi qu'un index bibliographique aussi détaillé que possible se trouvent dans notre thèse de doctorat ès sciences. On y trouvera un résumé des méthodes de dosage de la cellulose brute et de la cellulose pure, des essais de digestion faits sur l'homme et les animaux, une étude des facteurs qui influent sur cette digestion, un aperçu de la valeur nutritive qu'on peut donner à la cellulose, enfin un chapitre consacré aux agents de dissolution de la cellulose.

absorbent une quantité considérable et qu'on a fait la preuve aussi que leurs aliments ne contiennent pas de cellulase. Il ne restait donc après cela qu'une hypothèse qui fût plausible : la digestion par des micro-organismes.

L'étude de ces derniers dans la flore intestinale de l'homme et des animaux est loin d'être facile. Chaque fois qu'on a immergé de la cellulose dans des liquides provenant du tube digestif ou dans une solution contenant des matières fécales, elle se désagrégeait, mais on a presque toujours échoué lorsqu'on voulait isoler les espèces qui produisaient cette désagrégation.

A vrai dire, chez l'homme, on n'a même jamais réussi l'isolement de ces espèces et c'est pour combler cette lacune que, sur le conseil de M. le D^r M. Weinberg, nous nous sommes mise au travail avec le dessein de rechercher et, si faire se pouvait, d'isoler de la flore intestinale de l'homme normal les espèces microbiennes capables de digérer la cellulose pure.

Après beaucoup de tâtonnements et de longues recherches, nous avons réussi à isoler un microbe anaérobie strict, *le Bacillus cellulosa dissolvens*, n. sp., qui attaque la cellulose et qui n'attaque qu'elle.

* *

Nous nous en voudrions de clore cette courte introduction sans exprimer nos remerciements les plus vifs à M. le D^r M. Weinberg qui a bien voulu nous accueillir dans son laboratoire de l'Institut Pasteur où nous avons pu travailler dans les conditions les meilleures. Notre gratitude et nos remerciements vont aussi à M. le professeur G. Bertrand qui nous a, dans l'exécution de la partie chimique de ce travail, constamment aidée de ses conseils.

CHAPITRE I

ESSAIS D'ISOLEMENT

Pour isoler les microbes de la flore intestinale capables d'attaquer la cellulose nous avons préparé divers milieux de culture, liquides et solides :

A. Milieux liquides.

1° Solution d'Omeliânsky :

$\text{PO}^4\text{K}^2\text{H}$	1 gramme
SO^4Mg	0 gr. 5
$\text{SO}^4(\text{NH}^4)^2$	1 gramme
NaCl	traces
CO^3Ca	"
H^2O distillé	1.000 grammes

2° Dans cette solution, on peut remplacer le sulfate d'ammoniaque par de la peptone et ajouter un peu de gomme arabique pour rendre la culture plus facile. La peptone que nous avons employée était une peptone de viande pancréatique;

3° A la solution d'Omeliânsky nous avons ajouté du nitrate de potasse (3 grammes p. 1.000) et nous avons remplacé la peptone pancréatique par de la peptone de fibrine (Witte);

4° Nous avons supprimé le sulfate de magnésie et préparé le milieu suivant :

$\text{PO}^4\text{K}^2\text{H}$	1 gramme
NaCl	1 gramme
Peptone pancréatique	1 gramme
Eau du robinet.	1.000 grammes

5° Nous avons employé un mélange de phosphates composé de la sorte :

$\text{PO}^4\text{K}^2\text{H}$	0 gr. 5
$\text{PO}^4\text{Na}^2\text{H}$	0 gr. 5
NaCl	1 gramme
Peptone pancréatique.	1 gramme
CO^3Ca	2 grammes
Eau du robinet.	1.000 grammes

6° Enfin, nous avons préparé cette solution :

$\text{PO}^4\text{K}^2\text{H}$	5 grammes
NO^3K	2 gr. 50
NaCl	1 gramme
Peptone pancréatique	1 gramme
Eau du robinet.	1.000 grammes

Toutes ces solutions contenaient de la cellulose sous forme de papier Berzélius ou sous forme de cellulose précipitée après avoir été dissoute dans du réactif de Schweitzer.

Après avoir vigoureusement agité la solution pour obtenir une suspension homogène du carbonate de calcium, on en verse 5 cent. cubes dans des tubes qui contiennent de petits morceaux de papier de 1 cent. carré environ ou un peu de cellulose précipitée.

On stérilise à l'autoclave un quart d'heure à 110°. La réaction des milieux est neutre. Il faut avoir soin de vérifier la réaction du phosphate bipotassique du commerce qui est presque toujours un mélange de phosphates mono et bipotassique. Il est nécessaire de le neutraliser, en présence de phtaléine du phénol, par une lessive de potasse N/10;

7° Nous avons ajouté à tous ces milieux 2 p. 1.000 de glucose.

B. *Milieux solides.*

1° Nous nous sommes servi de la gélose ordinaire au bouillon Martin et de la gélose Veillon glucosée et nitratée, l'une et l'autre en boîtes de Pétri et en tubes de gélose profonde.

2° A ces milieux nous avons ajouté, soit du papier Berzélius très finement divisé, soit de la cellulose précipitée.

3° *Cellulose-agar de Kellermann et Mc Beth.* — On prépare 1 litre de solution diluée d'ammoniaque en mélangeant 3 parties d'eau à 10 parties d'ammoniaque de poids spécifique 0 gr. 90. On l'additionne d'un léger excès de carbonate de cuivre, on agite vigoureusement et on laisse une nuit en contact. Le lendemain on décante la solution à laquelle on ajoute 15 grammes de papier-filtre en morceaux et on agite de temps en temps jusqu'à ce que tout le papier soit dissous. On dilue à 10 litres et on ajoute lentement, en ayant soin d'agiter, une solution d'acide chlorhydrique au 1/5 jusqu'à précipitation complète de toute la cellulose. On dilue à 20 litres, on laisse la cellulose se déposer et on décante le liquide qui surnage. On lave par décantation avec de l'eau chlorhydrique jusqu'à obtention d'un liquide incolore. On termine par des lavages à l'eau pure afin que la réaction du chlore disparaisse. On laisse déposer le précipité de cellulose pendant plusieurs jours, on décante le plus de liquide possible, et au besoin on centrifuge pour que la quantité de cellulose soit de 1 gramme pour 100 cent. cubes d'eau.

A 500 cent. cubes de ce liquide contenant de la cellulose en suspension, on ajoute :

Agar-agar	10 grammes
PO ⁴ K ⁺ H	1 gramme
SO ⁴ Mg	1 gramme
NaCl	1 gramme
SO ⁴ (NH ⁴) ²	2 grammes
CO ³ Ca	2 grammes
Eau du robinet.	1.000 grammes

La gélose ainsi obtenue étant trop molle, nous avons généralement additionné les 1.500 cent. cubes de liquide de 20 grammes d'agar-agar. Nous le faisons fondre dans l'eau, puis nous ajoutons les différents sels et la solution contenant la cellulose. On agite vigoureusement et on répartit dans des tubes qu'on stérilise à 110° pendant un quart d'heure. Les plaques de gélose en boîtes de Pétri sont préparées lorsqu'on en a besoin et les tubes pour gélose profonde sont remplis le plus possible.

4° Le procédé de Mutterlein, de Lohnis et de Lochhead pour préparer des plaques de cellulose-agar est beaucoup plus simple. Il consiste à verser dans la boîte de Pétri une couche de gélose, d'étaler ensuite une feuille de papier et de verser une seconde couche de gélose qui contient une dilution des bactéries étudiées.

5° *Gélose-amidon de Kellermann et Mc Beth.* — A 800 cent. cubes d'eau bouillante, on ajoute 10 grammes d'amidon de pommes de terre en suspension dans un peu d'eau froide. On évapore à 100° jusqu'à ce que le volume se réduise à 500 cent. cubes. On brise ainsi l'enveloppe des grains d'amidon et on obtient une solution presque transparente.

On prend : 500 cent. cubes de cette solution; 10 grammes d'agar-agar; 1.000 cent. cubes de solution saline (la même que pour la gélose-cellulose).

On répartit dans des tubes et on stérilise à l'autoclave à 100° pendant un quart d'heure. On verse dans des boîtes de Pétri stériles lorsqu'on en a besoin.

Avec cette solution d'amidon nous avons voulu préparer des tubes de gélose profonde. Après addition d'agar-agar, même sans carbonate de calcium, la solution est très opaque; il faut la filtrer. Cette opération est très lente et ne peut se faire qu'à

l'autoclave, mais on obtient une gélose transparente qui laisse voir les colonies et permet de les isoler.

6° Nous avons humecté de la solution n° 4 des bandes de papier d'environ 1 centimètre de large sur 4 à 5 centimètres de long, et des tranches de pommes de terre et de carottes.

En possession de ces différents milieux, nous avons commencé nos essais d'enrichissement des cultures en espèces détruisant la cellulose, puis nous avons continué par nos essais d'isolement d'espèces pures.

Nous avonsensemencé tous nos milieux liquides avec des matières fécales humaines provenant d'individus des deux sexes et dont l'âge variait entre dix et cinquante-cinq ans.

Nous avons l'habitude de faire des dilutions de fèces dans deux tubes de chaque milieu, l'un pour les cultures en aérobie et l'autre pour les cultures en anaérobiose, et d'en ensemer plusieurs autres à partir de ceux-là. Nous n'avons pas tardé à remarquer que la cellulose n'était dissoute que dans les deux tubes primitifs où l'on avait fait la dilution. Nous avons alorsensemencé six milieux aérobies et six anaérobies avec des matières fécales.

L'anaérobiose des cultures est obtenue de la sorte : on fait bouillir les milieux pendant un quart d'heure environ pour chasser le plus d'air possible ; après refroidissement, on lesensemence. Les tubes sont étirés au centre et l'air aspiré à l'aide d'une machine pneumatique. Lorsque le vide est obtenu, on scelle au milieu de l'étranglement avec la flamme de la veilleuse d'un bec Bunsen.

Nous nous sommes vite aperçu qu'il était inutile d'ajouter du glucose ou du nitrate de potasse dans nos solutions nutritives. Les cultures étaient abondantes, un dégagement gazeux se produisait dès le premier jour, mais la cellulose n'était pas dissoute. Nous avons éliminé aussi le sulfate de magnésie (milieux liquides n°s 1 et 2), la peptone de fibrine (n° 3) et le mélange des deux phosphates (n° 5), parce qu'ils ne donnaient pas de meilleurs résultats que le milieu liquide n° 4. C'est ce dernier que nous avons employé dans nos essais ultérieurs.

La cellulose commence à se désagréger, en général, au bout de trois à cinq semaines, rarement après quelques jours, que ce soit de la cellulose précipitée ou du papier. La fermentation

s'établit dans les milieux aérobies et anaérobies, de deux manières : ou bien la cellulose devient jaune orange ou bien elle reste blanche et se ramollit; dans les deux cas elle se désagrège à la moindre secousse. Les réensemencements faits avec ces premières cultures donnent de bons résultats : il ne faut qu'une dizaine de jours pour que la désagrégation commence.

C'est avec ces cultures que nous avons essayé de faire des isollements. Une fermentation cellulosique en aérobiose avait spécialement attiré notre attention; le papier présentait une belle couleur jaune orange et se décomposait en formant des gaz, des acides et en exhalant une odeur butyrique assez forte.

Nous avons voulu obtenir sur des milieux solides des colonies isolées. Sans même avoir jamais remarqué autour d'elles la plus petite zone d'enzyme, nous avons essayé la pomme de terre, la carotte, les bandes de papier, la gélose-cellulose, la gélose ordinaire et la gélose Veillon. Tous les microbes qui poussent sur ces milieux, repiqués dans nos milieux liquides, n'ont jamais détruit la cellulose.

Après ces insuccès, nous avons essayé de faire des isollements dans les milieux liquides. Par la méthode des dilutions nous n'avons pas obtenu de cultures pures : tantôt le papier n'était pas attaqué, tantôt, lorsqu'il l'était, le milieu contenait plusieurs espèces.

Nous avons vu, ainsi que le disent plusieurs auteurs (Omeliansky, Merker, Groenewege, etc.), que les bactéries vivent attachées à la fibre cellulosique. Dans le liquide elles sont très rares. Pour nous débarrasser de celles qui y vivent, et qui sont sans action sur la cellulose, nous changions la solution dès qu'elle commençait à être trouble. Après avoir fait ainsi plusieurs fois nous constatâmes que les espèces étaient beaucoup moins nombreuses, mais que par réensemencement nous n'obtenions plus de fermentations. Nous avons fait ces réensemencements, sans plus de succès, dans tous les milieux qui nous avaient servi au début de nos recherches.

Nous avons alors supposé que ces cultures aérobies impures étaient des cultures anaérobies des bactéries qui détruisent la cellulose et que l'oxygène était absorbé par la flore associée. C'est pourquoi nous avons repris les résidus de fermentation cellulosique ne donnant plus de cultures aérobies et nous les

avonsensemencés en faisant le vide dans les milieux. Nous vîmes l'attaque du papier commencer au bout d'une dizaine de jours. Il est également possible de pratiquer des repiquages successifs. Avec ces cultures nouvelles nous avons poursuivi nos essais d'isolement sur nos divers milieux solides, cette fois en anaérobiose, mais tous les microbes qui poussent dans ces milieux, repiqués dans nos milieux liquides, n'ont jamais désagrégé la cellulose. Il nous est arrivé de voir aussi sur des bandes de papier des points clairs, où la cellulose avait été décomposée, mais les prélèvements faits sur ces taches se sont montrés riches en espèces diverses sans cependant qu'aucune d'elles attaquaît jamais la cellulose.

Comme nous avons remarqué, dans nos cultures, que le bacille vivant sur la fibre ainsi qu'un autre bacille étaient sporulés, nous avons essayé, sans y parvenir, d'éliminer les espèces non sporulées (colibacille et diplocoque) en les portant, soit à 100° pendant une à deux minutes, soit à 80° pendant cinq à dix minutes, soit à 50 ou à 60° pendant quinze à vingt minutes : ils résistaient ou bien, ce qui entraînait l'arrêt de la fermentation cellulosique, ils étaient tués.

Nous avons essayé d'une autre manière de nous débarrasser des espèces qui n'ont aucune action sur la cellulose. Dès que le morceau de papier commençait à présenter quelques taches jaune orange, nous le lavions, pendant dix minutes environ, dans trois boîtes de Pétri remplies d'eau physiologique. Ainsi lavé il était mis dans un tube contenant le milieu n° 4, et dans lequel on faisait le vide ; huit jours après on pouvait recommencer les lavages avec le morceau de papier du tubeensemencé, car il présentait à son tour quelques taches jaune orange. Mais, après lavage du fragment de papier d'un troisième tube, on n'obtenait plus d'attaque de la cellulose, même en le laissant plusieurs mois à l'étuve.

A ce moment nous ne nous trouvions plus en présence que de deux espèces : un bacille sporulé et un diplocoque. Nous pouvions donc espérer d'obtenir des cultures pures en combinant ces deux modes opératoires : lavage du papier et destruction des espèces non sporulées par le chauffage, mais l'inconvénient, c'est qu'il devenait très rapidement impossible d'obtenir des cultures.

Comme les résultats n'étaient pas meilleurs avec les différents milieux dont nous avons donné plus haut la composition, nous avons modifié notre milieu de culture en y ajoutant un extrait de matières fécales ainsi préparé : on délaie 1 partie de matières dans 8 à 10 parties d'eau distillée et on filtre sur filtre Laurent. Au début le liquide filtré est trouble ; on le remet sur le filtre jusqu'à ce qu'il soit parfaitement clair. La filtration est très lente. Le filtrat est d'abord coloré en marron clair, mais il fonce à l'air. On le stérilise à l'autoclave à 110° pendant un quart d'heure. Durant la stérilisation il se forme un précipité qu'on laisse déposer pour n'employer que le liquide clair. C'est cet extrait fécal qui entre dans la composition de notre milieu liquide n° 4 ainsi modifié :

PO ⁴ K ³ H	1 gramme
NaCl	1 gramme
Peptone pancréatique	1 gramme
CO ³ Ca	2 grammes
Eau	750 cent. cubes
Extrait fécal	250 cent. cubes
Cellulose	»

C'est de ce milieu qu'il s'agira désormais quand nous parlerons de milieu de culture, car c'est lui qui nous a donné les résultats les meilleurs, et nous l'avons conservé pour tous nos essais.

Dans ce milieu nous avons mis des fragments de papier lavés qui ne donnaient plus de culture et qui étaient restés six mois à l'étuve en anaérobiose. Après une incubation de trois à cinq semaines, le papier présentait une belle couleur jaune orange et se désagrégeait très facilement. Les bacilles à spore terminale, attachés à la fibre cellulosique, étaient très nombreux. On trouvait encore le diplocoque dont il était facile de se débarrasser par une ébullition de quelques minutes, et la culture était enfin pure.

Nous avons isolé un bacille anaérobie, différent de ceux d'Omeliansky, et que nous désignerons sous le nom de *Bacillus cellulosa dissolvens*, n. sp.

Voici la technique que nous avons définitivement adoptée pour le retrouver dans les matières fécales de l'homme : il faut

tout d'abord ensementer largement plusieurs milieux de culture (6 au minimum) avec des matières fécales et réaliser un vide tel que la pression d'air ne dépasse pas 1 centimètre de mercure. La fermentation commence, en général, au bout de trois à cinq semaines, dans quelques tubes seulement. Lorsqu'elle est assez avancée, on réensemence les débris de papier qui sont ramollis, blancs ou jaunes. Dans les nouvelles cultures l'attaque est plus rapide. Après deux ou trois repiquages elle commence dès le troisième jour, les morceaux de papier deviennent jaune orange et les bacilles ont une spore ovale qui n'est pas toujours visible dans les premières cultures. A compter de ce moment, on peut chercher à isoler le *Bacillus cellulosa dissolvens*. Dès que le fragment de papier présente quelques taches colorées, on le lave pendant dix minutes environ en le faisant passer dans trois boîtes de Pétri remplies d'eau physiologique et on le met dans un nouveau milieu de culture. La fermentation s'établit alors plus lentement. Lorsqu'elle est très active on réensemence; on fait bouillir les tubes nouvellement ensementés pendant cinq minutes. En combinant ces deux modes opératoires, on arrive à se débarrasser des espèces qui n'attaquent pas la cellulose. Il est indispensable de recommencer plusieurs fois en prenant toutes les précautions nécessaires pour éviter les contaminations. On peut aussi chauffer les cultures pendant un temps plus long, car, ainsi que nous le verrons, la spore du *Bacillus cellulosa dissolvens* résiste longtemps à la chaleur. Il est très utile de contrôler la pureté des souches par des ensementements dans les milieux de culture ordinaires.

En possession de ce moyen d'isolement, nous avons pu, dans soixante matières fécales, retrouver le *Bacillus cellulosa dissolvens* trente-six fois, donc dans 60 p. 100 des cas étudiés.

CHAPITRE II

CARACTÈRES DU *BACILLUS CELLULOSE DISSOLVENS*A. *Morphologie.*

Le *Bacillus cellulose dissolvens* a la forme d'un mince bâtonnet à spore terminale ovulaire (fig. 1 et 2). Les individus les plus courts ont $2\ \mu\ 5$; ils s'allongent au moment de la sporulation et peuvent atteindre $12\ \mu\ 5$; ils sont en général isolés, quelquefois groupés par deux, mais ne forment pas de chaînettes. Ils vivent attachés à la fibre cellulosique par l'extrémité non sporulée ainsi que le montre la figure 3. Le *Bacillus cellulose dissolvens* n'a pas de cils; nous avons vainement essayé d'en colorer par la méthode de M. Nicolle-Morax et par celle de Van Ermengen. Il est immobile et ne présente qu'un mouvement d'ondulation sur place; c'est pourquoi après fixation on trouve des bacilles droits et des bacilles ondulés.

Il ne se colore pas par la méthode de Gram, mais il est facile de le colorer par la fuchsine diluée, le bleu de méthylène, le violet de gentiane, etc... Ces diverses colorations montrent que son protoplasme n'est pas homogène; il présente des espaces clairs, incolores, et des points colorés. Nous avons essayé, sans résultat, de colorer ces espaces clairs par la méthode de Romanowsky et le mucicarmine de Mayer.

La spore du *Bacillus cellulose dissolvens* est terminale, ovulaire, volumineuse par rapport au corps microbien; elle a $2\ \mu\ 5$ de long et $2\ \mu$ de large. Il est aisé d'en suivre le développement. A une extrémité des formes bacillaires allongées apparaît un point qui se colore plus fortement que le reste du corps microbien. Ce point grossit, il est d'abord circulaire et nettement ovoïde quand la spore est mûre. Pendant son développement on voit le corps du bacille se désagréger, se séparer complètement de la spore et dans les vieilles cultures on ne trouve plus que des spores libres. Nous avons coloré ces spores par les deux procédés spéciaux de la fuchsine anilinée à chaud, et de la fuchsine à chaud après mordantage à l'acide chromique (Moeller). Elles se colorent aussi par les colorants du corps

microbien. Dans tous les cas, elles présentent une exospore fortement colorée, et la spore elle-même, qui n'est jamais incolore, une teinte plus claire.

Pour déterminer la résistance des spores à l'ébullition, voici comment nous procédons. Nous mettons au bain-marie les milieux. Dès qu'ils commencent à bouillir, nous les ensemençons le plus rapidement possible et reportons immédiatement les tubes au bain-marie. En opérant ainsi, nous avons vu les spores résister quarante-cinq à cinquante minutes à la température de 100°. Elles ne germent alors qu'au bout de dix jours.

La description morphologique que nous venons de donner est celle du *Bacillus cellulosaë dissolvens* poussant dans le milieu de culture qui lui convient le mieux. Sa forme se modifie quand on change ce dernier. Dans ce cas il s'amincit et perd ses spores comme on peut le voir sur la figure 5 qui le représente en bouillon Martin additionné de cellulose.

B. Conditions de culture.

La spore germe au bout de dix jours, mais, si nous partons d'une culture qui fermente abondamment, la destruction de la cellulose se manifeste au bout de trois à quatre jours. Le papier devient jaune orange et se ramollit, ou bien présente quelques taches qui vont s'élargissant. A la moindre secousse il tombe en poussière. Au microscope cette poussière apparaît formée de fibres cellulosiques recouvertes d'un enduit jaunâtre, et qui disparaissent sous un amas de microbes (fig. 4). La décomposition des petits fragments de papier dure vingt-quatre à quarante-huit heures, pendant lesquelles on observe un dégagement gazeux; le liquide reste toujours limpide, mais, de brun foncé qu'il était avant l'ensemencement, il devient brun clair.

Influence du nombre de microbes ensemencés. — Comme le papier tombe au fond du tube et qu'il n'y a que peu de microbes dans le liquide, lorsqu'on ensemence il faut avoir soin d'agiter. Avec une goutte de cette culture, ensemencée à l'aide d'une pipette Pasteur, la fermentation ne commence qu'au bout de trois à quatre semaines, mais lorsqu'on prend V gouttes environ

elle commence après un séjour à l'étuve de trois à quatre jours. On a donc tout intérêt à ensementer largement.

Influence de l'oxygène. — Dans nos cultures ordinaires, nous avons l'habitude de faire le vide sans le mesurer exac-

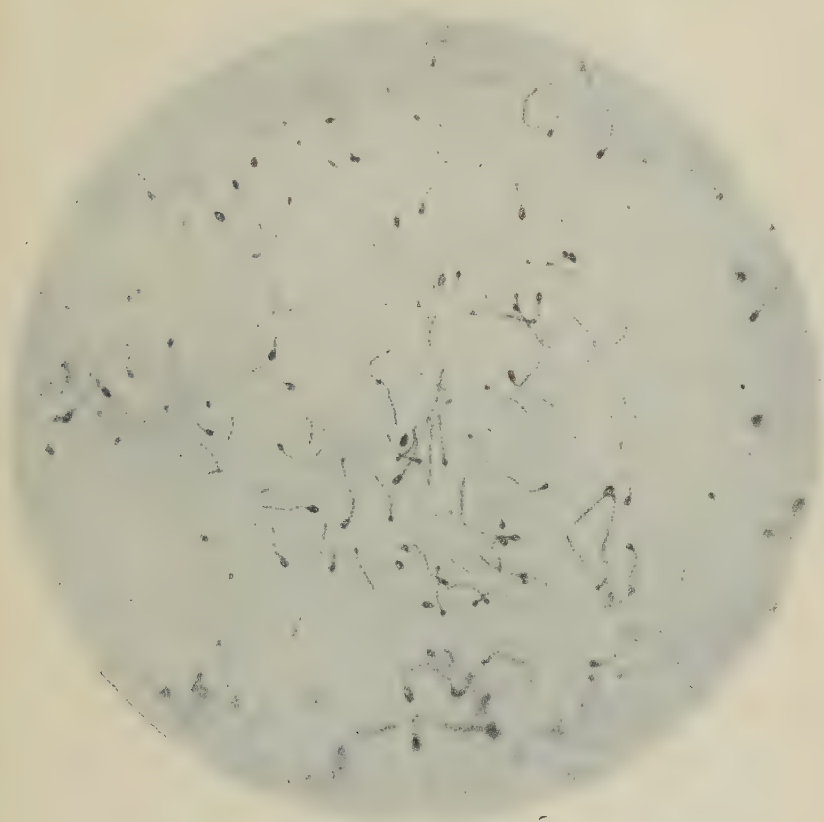


FIG. 1. — Culture en solution saline additionnée d'extrait fécal.

tement; nous nous contentons en général de faire bouillir le liquide dans le vide pendant quelques minutes jusqu'à ce que le dégagement gazeux soit très faible. Mais nous avons cherché à connaître d'une manière exacte la pression d'air minimum qui arrête le développement du *Bacillus cellulosæ dissolvens*. Nous avons fait le vide avec une trompe à mercure et mesuré

la pression d'air à l'aide d'un manomètre à mercure intercalé entre la trompe et le tube du milieu de culture. Nous avons évité les causes d'erreur dues aux caoutchoucs en faisant tous les joints à la cire Golaz. Pour que le vide soit plus facile à



FIG. 2. — Culture en solution saline additionnée d'extrait fécal.

obtenir, nous nous sommes servi de tubes de diamètre assez large (18 à 20 millimètres), de façon à avoir une surface plutôt grande, et une hauteur de liquide (5 cent. cubes) aussi petite que possible, et, de plus, nous avons fait bouillir pendant une demi-heure les milieux avant de les ensemençer. Le vide que donne la trompe à mercure est obtenu en laissant « taper » le

mercure deux à trois heures, jusqu'à ce que l'eau de distillation n'entraîne plus de bulles d'air. Nous avons de plus réalisé des pressions d'air de 2, 5, 7 et 12 millimètres de mercure, et de toutes nos expériences il ressort que le *Bacillus cellulosæ*

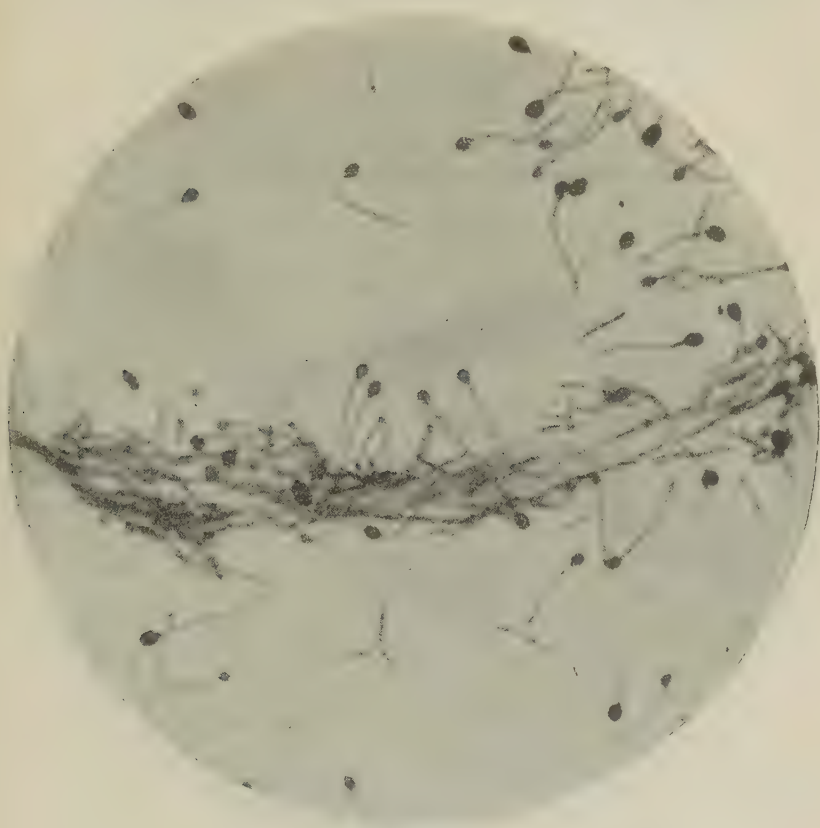


FIG. 3. — Microbes attachés à la fibre cellulosique par leur extrémité non sporulée.

dissolvens pousse normalement dans les milieux où règne un vide aussi parfait que possible et dans ceux où la pression d'air ne dépasse pas 7 millimètres de mercure; quand elle atteint 12 millimètres, on n'observe plus de développement.

Pour nous assurer que c'est bien l'oxygène de l'atmosphère qui est toxique pour ce microbe, nous avons fait une culture

en présence d'azote. Dans ce cas son développement a été normal. De plus, nous avons, dans des essais quantitatifs effectués sur de grandes quantités de cellulose, réalisé une atmosphère de gaz carbonique et d'hydrogène de la manière suivante : un ballon où règne le vide est fermé par une soupape de Bunsen.

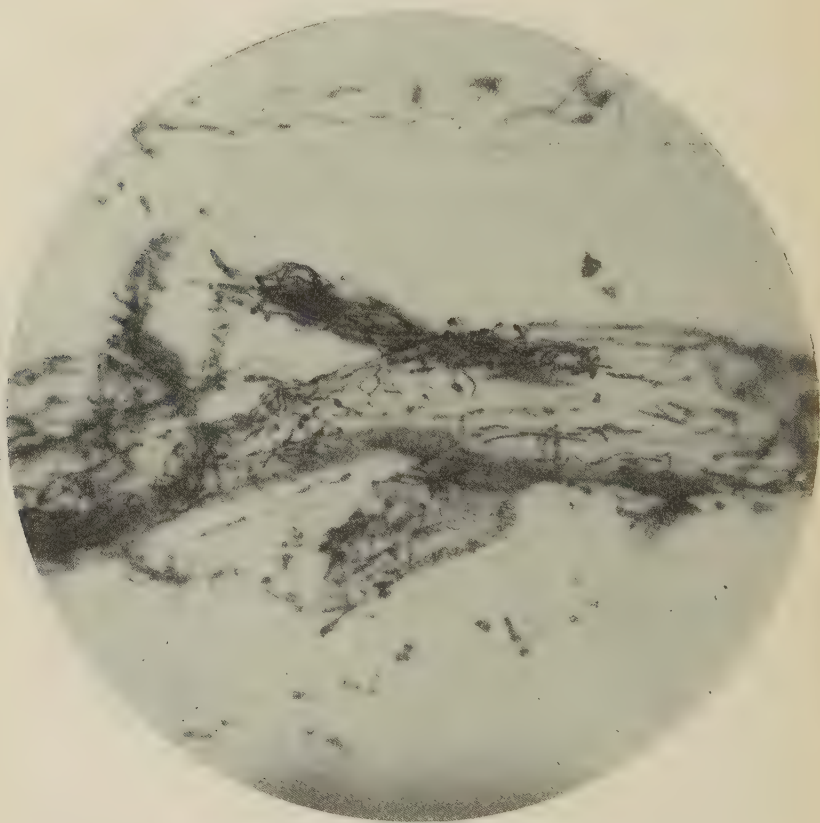


FIG. 4. — Fibres cellulosiques
se transformant en amas microbiens.

Les gaz de la fermentation cellulosique, — gaz étudiés plus loin et qui sont composés de gaz carbonique et d'hydrogène —, emplissent à un moment donné le volume libre au-dessus de la surface du liquide. Quand leur pression est supérieure à la pression atmosphérique, ils se dégagent par la soupape. La culture a continué en présence de gaz carbonique et d'hydro-

gène pendant huit mois. Nous pouvons donc conclure de ces expériences, puisque, d'une part, il est avéré que ni l'azote, ni l'hydrogène, ni le gaz carbonique, ni même l'absence totale d'air ne nuisent au développement du *Bacillus cellulose dissolvens*, et que, d'autre part, l'air atmosphérique, à partir de



FIG. 5. — Culture en bouillon Martin additionnée de cellulose.

12 millimètres de pression, l'empêche de pousser, nous pouvons donc conclure que le bacille est une espèce strictement anaérobie.

Influence de la température. — Quelle est la température à laquelle le développement du *Bacillus cellulose dissolvens* est

le plus rapide? Pour répondre à cette question, nous avons fait des cultures à 22°, 33°, 35°, 37°, 44°, 47°, 51°, 57°, 62° et 67°.

A 22°, pas de culture, même après deux mois de séjour à l'étuve. Si, après ce temps, on reporte les tubes à 37°, la fermentation commence au bout de neuf jours.

A 33°, le développement du bacille ne commence qu'au bout de trois semaines, tandis qu'il se fait en quelques jours (trois-quatre) de 35° à 51°, sans qu'on puisse remarquer un optimum très net.

Cependant, bien que poussant à des températures élevées, le *Bacillus cellulosa dissolvens* n'est pas un bacille thermophile; il ne pousse pas à 57°, ni à 62°, même après douze jours d'étuve.

A 62°, le microbe et sa spore ne sont pas tués, même après douze jours d'étuve, car, remis à 37°, ils ont attaqué la cellulose au bout de six jours, tandis que des tubes laissés douze jours à 67° n'ont pas donné de culture à 37°, même après plusieurs mois de séjour à l'étuve. Il est donc bien établi que le *Bacillus cellulosa dissolvens* n'est pas un bacille thermophile.

En ce qui concerne la digestion de la cellulose, il n'est pas sans intérêt de remarquer qu'il pousse facilement à des températures supérieures à 37°, et que, par conséquent, selon toute vraisemblance, il doit exister dans le tube digestif des herbivores.

Influence de la réaction du milieu. — Nous employons toujours, pour nos cultures ordinaires, des solutions neutres au tournesol, le carbonate de calcium neutralisant les acides de fermentation.

Nous avons remarqué que la présence de carbonate n'est pas indispensable dans les milieux qui contiennent peu de cellulose. Le développement du *Bacillus cellulosa dissolvens* est normal et des repiquages successifs peuvent être faits sans qu'on observe des modifications morphologiques ou biologiques, bien que la réaction du milieu soit devenue légèrement acide.

Nous avons voulu déterminer le degré minimum d'acidité qui arrête la fermentation. Pour cela, nous avons préparé le milieu suivant :

PO ⁴ K ² H	0 gr. 40
NaCl	0 gr. 40
Peptone pancréatique	0 gr. 10
Extrait fécal.	25 cent. cubes
Eau	75 cent. cubes
Cellulose	1 gramme

La culture est apparue au bout de six jours et a duré dix jours. A ce moment, nous avons dosé l'acidité de la solution : 40 cent. cubes de liquide filtré sont neutralisés, en présence de phtaléine du phénol, par 4 c.c. 2 de lessive de soude N/10.

Nous avons pu vérifier ce fait une autre fois, dans des conditions différentes, dans un milieu qui contenait du carbonate de calcium, mais que nous n'avions pas pris soin d'agiter suffisamment pour neutraliser les acides au fur et à mesure de leur formation. A la fin de la fermentation, nous avons constaté que l'acidité de 40 cent. cubes de liquide filtré était neutralisée par 4 c.c. 2 de lessive de soude N/10. Cette acidité empêche le développement du *Bacillus cellulosaë dissolvens* (nous verrons que la quantité de cellulose décomposée est la moitié de celle qui disparaît quand le milieu est neutre), mais elle ne le tue pas. Il est possible de faire des réensemencements lorsqu'il est resté plus de dix jours dans ces milieux acides.

Pour que la fermentation ne s'arrête pas, il est indispensable de neutraliser l'acidité. Nous nous servons de carbonate de calcium qui donne de très bons résultats si on a soin d'agiter vigoureusement matin et soir les ballons de culture et de neutraliser de la sorte les acides de fermentation. C'est ainsi que 25 grammes de cellulose ont pu fermenter pendant huit mois sans arrêt.

Nous avons voulu obtenir des cultures en milieu légèrement alcalin pour nous rapprocher des conditions intestinales. Comme l'extrait fécal se décompose à l'ébullition en présence d'alcali, on ne peut pas songer à préparer un milieu alcalin et à le stériliser à l'autoclave. Il faut ajouter l'extrait stérile à la solution alcaline titrée et stérile. Nous avons préparé, en évitant le plus possible les causes d'erreur dues aux nombreuses manipulations et à l'évaporation dans le vide, des milieux dont l'alcalinité était de 2 p. 100 de lessive de potasse N/10 et nous avons constaté que le *Bacillus cellulosaë dissolvens* y pousse aussi bien

que dans des milieux neutres et qu'il peut être réensemencé sans difficulté.

De toutes ces expériences, nous pouvons conclure que la réaction du milieu influe peu sur le développement de ce bacille.

Il n'en est pas de même de la composition du milieu.

Influence de la composition du milieu de culture. — Nous avons d'abord essayé de voir si le *Bacillus cellulosa dissolvens* pousse dans les milieux de cultures qu'on emploie ordinairement au laboratoire et qui sont neutralisés en présence de phtaléine du phénol. Nous avons ensemencé sans aucun succès le bouillon Martin simple, le bouillon Martin glucosé, le bouillon Martin au blanc d'œuf coagulé, au foie, à la viande; la gélatine, la gélose de Veillon, le sérum coagulé et le lait tournesolé. Nos cultures sont restées un mois et demi à l'étuve sans présenter le moindre trouble. Au bout de deux à trois jours, alors que les milieux ainsi ensemencés ne révélaient à l'examen microscopique que de très rares bacilles (ceux que nous avons introduits), nous avons fait des repiquages dans notre milieu nutritif. Ces repiquages ont donné des cultures. Il est donc évident que les bacilles ensemencés dans les milieux ordinaires n'ont pas proliféré tout en restant vivants.

La figure 6 montre la culture que nous avons réalisée dans notre milieu solidifié par de la gélose au bouillon Martin : On fait bouillir le milieu à ensemencer pendant une demi-heure pour chasser l'air qu'il contient; on l'ensemence largement lorsqu'il est refroidi à 40°. Après refroidissement complet, on ajoute quelques centimètres cubes d'huile de vaseline stérile pour empêcher toute rentrée d'air. On peut aussi ensemencer le tube bouillant et maintenir l'ébullition pendant quelques minutes pour ne laisser germer que des spores. La culture commence au bout d'une dizaine de jours. Le fragment de papier présente quelques taches jaunes lorsque la culture est chauffée et il est attaqué sur une grande partie de sa surface lorsqu'elle ne l'est pas. Sur la figure 6, la pigmentation apparaît en noir. On voit très nettement que le *Bacillus cellulosa dissolvens* ne forme pas de colonies, mais qu'il vit sur la

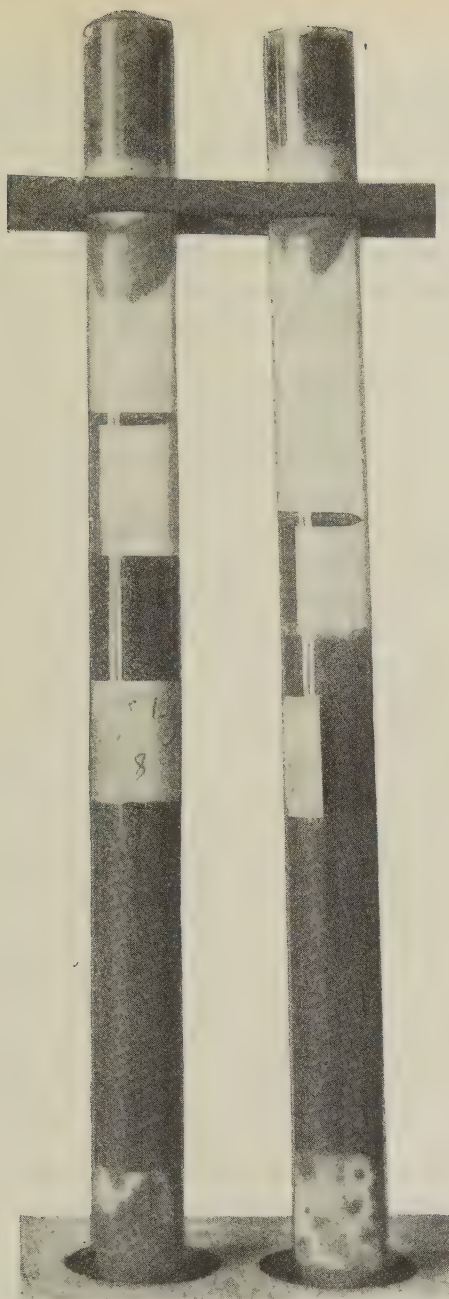


FIG. 6. — Aspect des cultures en gélose profonde contenant un fragment de papier.

fibre cellulosique elle-même. On ne peut songer à utiliser cette particularité pour faire des isolements, car, sur du papier divisé en fibrilles et réparti dans la gélose, il est impossible de remarquer la pigmentation. Il nous est arrivé une fois, tout à fait par hasard, de repiquer une fibrille qui nous a donné une culture en milieu liquide; en vain, nous avons essayé plusieurs fois de recommencer. Cet essai, en gélose, n'a d'intérêt, fait avec des cultures pures, que pour montrer l'absence totale de colonies.

Au bouillon additionné d'un morceau de foie nous avons ajouté de la cellulose, mais le *Bacillus cellulosæ dissolvens* n'a pas poussé. Avec une souche que nous possédions depuis plus d'un an et qui a été très souvent repiquée, nous avonsensemencé du bouillon Martin simple et du bouillon Martin glucosé additionnés de cellulose. L'ensemencement ayant été fait très largement, la fermentation a commencé au bout de trois jours. Nous avons alors suivi plus particulièrement le développement du *Bacillus cellulosæ dissolvens* en bouillon Martin additionné de cellulose. A partir du troisième ensemencement, la fermentation ne commence qu'au bout de six jours. Le pigment est jaune clair, le bacille perd ses spores (on n'en trouve que quelques-unes par préparation). Il devient plus mince et plus allongé. La figure 5 montre l'aspect du bacille à ce moment. Le cinquième ensemencement ne donne une culture qu'au bout de neuf jours, le morceau de papier est ramolli, blanc, et ce n'est qu'après deux à trois jours de fermentation qu'il devient jaune pâle. Au septième ensemencement, on ne voit plus du tout de spores. Les bacilles sont très minces et assez courts. Le papier ne commence à se désagréger qu'au bout de huit à dix jours. La fermentation est si lente que le dégagement gazeux ne peut être perçu. Pour le mettre en évidence, il faut secouer légèrement le tube, ce qui fait apparaître de très petites bulles de gaz. Le fragment de papier n'est désagrégé qu'au bout de quatre à six jours; il est à peine coloré. Les propriétés du *Bacillus cellulosæ dissolvens* se sont donc modifiées, par la seule raison que la composition du milieu ne répondait pas exactement à ses besoins.

Nous avons essayé à ce moment, mais sans plus de succès que précédemment, de le faire pousser en bouillon Martin simple.

Nous avons déjà donné la formule du milieu qui convient le mieux à son développement. Dans ce milieu, ses caractères sont constants et les repiquages peuvent être indéfiniment pratiqués. Une souche que nous possédons a été repiquée plus d'une trentaine de fois sans qu'il soit possible de remarquer une modification quelconque dans la morphologie du bacille, sa période d'incubation ou l'attaque de la cellulose.

Si dans ce milieu on supprime l'extrait fécal, on s'aperçoit qu'un premier ensemencement donne une culture lente, que la pigmentation du papier est peu marquée et que le bacille n'a plus de spore. Un deuxième ensemencement ne donne aucune attaque.

Le milieu d'Omeliansky, avec ou sans gomme arabique, ne convient pas du tout au *Bacillus cellulosæ dissolvens*, que la source d'azote soit de la peptone ou du sulfate d'ammoniaque.

L'addition de bile de bœuf à nos cultures s'est montrée nettement empêchante. La fermentation ne commence qu'après un mois de séjour à l'étuve et le troisième ensemencement ne donne pas de culture. Dans la bile de bœuf additionnée de cellulose, nous avons pu obtenir une seule culture. Dans tous les cas, le bacille est très mince, court et ne présente pas de spores. Cet aspect, que nous retrouverons encore, semble bien indiquer que les milieux de culture employés sont insuffisants pour assurer son développement normal.

Nous avons voulu nous assurer que l'action de l'extrait fécal ne pouvait être comparée à celle qu'exercent la vitamine B et le filtrat de cultures de *Mucor* de M. Goy.

Nous avons remplacé, dans nos cultures, l'extrait par quelques centimètres cubes de solution au cinquième de vitamine B provenant de la levure. La première culture est très lente; au bout de trois semaines, le papier présente quelques taches à peine colorées en jaune, le bacille n'est pas sporulé, et par un deuxième ensemencement il est impossible d'obtenir une culture. De plus, des rats dévitaminés meurent en trois jours si on ajoute à leur ration (riz glacé, caséine dévitaminée, beurre et solution saline) 3 cent. cubes d'extrait fécal alcoolique repris par l'eau.

Avant de donner les résultats obtenus avec les filtrats de cultures de *Mucor*, nous rappellerons le procédé de M. Goy

pour les obtenir. Il emploie deux filtrats qui proviennent de cultures en milieu de Mayer saccharosé à 5 p. 100 ou en bouillon de viande glucosé à 1 p. 100. Dans les deux cas, les cultures sont filtrées après quinze jours d'étuve à 25°-27° et stérilisées à l'autoclave à 120° pendant cinq minutes.

On ajoute 7 à 10 cent. cubes de ces filtrats aux milieux de cultures. Lorsqu'on remplace l'extrait fécal par le filtrat de cultures de *Mucor* en milieu de Mayer, on voit la fermentation cellulosique ne commencer qu'après trois semaines et le pigment jaune orange être très pâle. Huit jours plus tard, l'attaque n'est pas beaucoup plus prononcée. En réensemencant alors, on voit, au bout de trois semaines, une éphémère et légère désagrégation. Le bacille est très mince, court et non sporulé.

Si, au contraire, on emploie le filtrat de cultures de *Mucor* en bouillon de viande, les résultats sont meilleurs; les cultures deviennent perceptibles au bout d'une dizaine de jours et le microbe est sporulé. Une deuxième attaque n'est obtenue qu'après une période d'incubation de dix jours; il faut ensuite quinze jours d'étuve pour que le fragment de papier soit détruit, et le pigment jaune est très pâle.

De ces essais il ressort que les filtrats de cultures de *Mucor*, si actifs vis-à-vis des levures et de nombreux microbes, ne favorisent pas le développement du *Bacillus cellulosæ dissolvens*. L'action, très légère, du filtrat de culture en bouillon n'est due qu'au bouillon lui-même et l'action, si faible, du filtrat de culture en milieu de Mayer peut être négligée. Nous avons vu qu'il est possible, en effet, d'obtenir une fermentation dans le milieu n° 4 qui ne contient pas d'extrait fécal.

Pour résumer ces recherches sur la composition du milieu de culture, nous dirons que le *Bacillus cellulosæ dissolvens* préfère, à toute autre source d'azote, les produits dégradés qu'il trouve dans l'extrait fécal.

COMPOSITION DE L'EXTRAIT DE MATIÈRES FÉCALES. — Nous avons cherché à connaître la composition de l'extrait fécal indispensable au bon développement du *Bacillus cellulosæ dissolvens* dans les milieux minéraux. Pour éliminer les peptones et les sels qu'on peut trouver dans les extraits aqueux de fèces, nous avons fait un extrait alcoolique de la manière suivante : 25 grammes de

matières sont délayées dans 80 cent. cubes d'alcool à 95°; on évapore rapidement l'alcool à l'étuve à 37° et on reprend le résidu par 100 cent. cubes d'eau distillée. On obtient un liquide trouble qui tient en suspension de nombreuses particules solides. Une partie est stérilisée telle quelle à 110° pendant un quart d'heure; une autre partie, filtrée sur un filtre de papier, reste trouble et est également stérilisée; la dernière partie est stérilisée par filtration à travers une bougie L. 3. Comme les opérations ont été faites rapidement, ce dernier filtrat n'a pas eu le temps de s'oxyder complètement et n'est pas coloré en brun foncé. Nous nous sommes assuré que ces diverses préparations n'étaient pas moins actives que l'extrait aqueux et nous avons pu remarquer qu'avec l'extrait alcoolique filtré à la bougie et pas encore coloré en brun foncé, les cultures sont beaucoup moins bonnes. Elles redeviennent normales si on ajoute un extrait complètement oxydé à l'air.

Nous avons fait sur l'extrait alcoolique limpide et sur l'extrait aqueux les réactions qu'on fait d'ordinaire quand on analyse des fèces, c'est-à-dire que nous avons recherché l'indol, le scatol, l'hydrobilirubine, les pigments biliaires, les acides biliaires et la cholestérine.

Voici quelles réactions nous avons employées et les résultats qu'elles nous ont donnés :

Indol et scatol. — 5 cent. cubes d'extrait sont agités avec 3 cent. cubes d'éther de pétrole; l'éther décanté est additionné de 1 cent. cube de solution alcoolique de paradiméthylamidobenzaldéhyde à 2 p. 100 et de 1 cent. cube d'acide chlorhydrique pur. L'indol doit donner une coloration rouge et le scatol une coloration bleue. Nous ne les avons jamais obtenues. En répétant ces réactions après avoir fait bouillir l'extrait fécal avec de la lessive de soude, nous avons pu, une fois, mettre en évidence du scatol.

Hydrobilirubine. — 10 cent. cubes d'extrait sont additionnés de 3 à 4 gouttes de solution de persulfate de soude à 5 p. 100 et d'assez d'acide acétique au dixième pour obtenir une réaction légèrement acide. On ajoute ensuite au mélange un excès d'acétate de zinc pulvérisé et un volume d'alcool à 95° égal au volume total du liquide. On agite et on laisse en repos pendant quelques heures. Le liquide présente une fluorescence

verte plus ou moins vive en présence d'hydrobilirubine. Nous n'avons obtenu cette coloration qu'avec un seul extrait; elle était, du reste, très faible.

Pigments biliaires. — On verse 1 cent. cube d'extrait dans un tube à essai, on ajoute 5 cent. cubes d'une solution de chlorure de baryum à 10 p. 100 et de l'eau de baryte en quantité suffisante pour rendre le mélange alcalin, puis on agite vivement. On jette sur un filtre et on lave le précipité avec un peu d'eau distillée. On perce alors le filtre et on fait tomber le précipité dans un tube au moyen de 5 cent. cubes d'alcool à 90° auxquels on ajoute 5 gouttes d'acide chlorhydrique à 22° B. On place le tube dans un bain-marie bouillant pendant une minute, puis l'on examine. Le précipité doit être coloré en vert plus ou moins foncé.

Nous n'avons jamais obtenu cette coloration du précipité; il se dissout dans l'alcool chlorhydrique.

Acides biliaires. — On verse dans un tube à essai 3 cent. cubes d'eau, puis on y laisse couler avec précaution 6 cent. cubes d'acide sulfurique concentré. On agite doucement, sous un courant d'eau, pour refroidir le mélange. Quand celui-ci est bien homogène, on ajoute 6 gouttes d'une solution de lévulose à 10 p. 100, puis 1 cent. cube d'extrait fécal. En présence d'acides biliaires, le liquide prend une teinte rose qui, au bout de dix minutes, devient rose violacé.

Jamais nous n'avons trouvé d'acides biliaires dans l'extrait fécal.

Cholestérine. — 10 cent. cubes d'extrait sont agités avec 3 cent. cubes de chloroforme. Le chloroforme, séparé du liquide aqueux, est mis dans un tube à essai avec 1 cent. cube d'anhydride acétique et 5 cent. cubes d'acide sulfurique pur. Au bout d'une demi-heure, nous avons eu une légère coloration verte. Si on veut qu'elle soit plus intense, il faut opérer sur une plus grande quantité d'extrait, évaporer le chloroforme et dissoudre le résidu d'évaporation dans 1 cent. cube de chloroforme en continuant comme ci-dessus.

Ce n'est pas la cholestérine que contient l'extrait fécal qui favorise le développement du *Bacillus cellulosa dissolvens*, car nous avons incorporé de la cholestérine pure à la solution n° 4 sans qu'il nous ait été possible de le faire pousser. Ce qui lui

est indispensable, c'est la substance qui colore l'extrait en brun foncé. En effet la couleur du milieu se modifie pendant la fermentation : brun foncé au début, elle est, à la fin, marron clair, et on voit au fond des tubes et des ballons un précipité fortement coloré, soluble dans l'acide chlorhydrique à 10 p. 100, insoluble dans l'alcool et dans l'éther. L'alcool amylique qui ne décolore pas l'extrait fécal décolore, au contraire, presque entièrement la solution chlorhydrique.

Action de l'eau. — Les bandes de papier humectées de solution nutritive dont nous nous sommes servi pour les isoléments nous ont montré que les microbes se développent surtout au fond du tube, là où il y a quelques gouttes de liquide. A cause de cela nous avons supposé que les microbes ne poussaient bien que dans une grande quantité de solution nutritive et nous avons vérifié cette hypothèse avec le *Bacillus cellulosæ dissolvens*. Nous avons préparé des milieux de culture qui contenaient une bande de papier dont la moitié inférieure seule plongeait dans la solution et nous les avons largement ensemencés. Nous les avons mis à l'étuve en prenant la précaution de ne plus les agiter. Au bout de quelque temps la partie immergée était jaune orange et se désagrégeait au moindre choc; l'attaque du papier s'arrêtait au niveau du liquide, et la partie supérieure restait intacte, jusqu'au moment où elle était plongée à son tour dans la solution.

*Action du Bacillus cellulosæ dissolvens
sur les hydrates de carbone.*

Nous avons, dans notre milieu de culture, remplacé la cellulose par différents hydrates de carbone : on prépare des solutions concentrées de sucres réducteurs stérilisées en ne dépassant pas 105° et titrées par la méthode de G. Bertrand pour connaître exactement leur teneur en sucre; on prépare également des solutions concentrées, stériles, d'alcools et d'hydrates de carbone condensés. On leur ajoute une quantité suffisante de solution nutritive pour que leur concentration soit de 1, 2, 3, 4, 5 p. 100 et que le volume total ne dépasse pas 5 cent. cubes.

Après deux jours d'étuve, pour contrôler la stérilité des milieux, on ensemence largement avec une culture du *Bacillus cellulosa dissolvens* en pleine fermentation.

Voici les hydrates de carbone que nous avons essayés :

Pentoses : Arabinose, xylose.

Hexoses : Glucose, lévulose, galactose.

Bioses : Saccharose, maltose, lactose, cellose.

Alcools : Glycérine, mannite, dulcite.

Hydrates de carbone condensés : Inuline, amidon soluble.

Les cultures sont restées un mois et demi à l'étuve et le milieu n'a jamais été trouble; il n'y a pas eu de dégagement gazeux et l'on a vu au microscope que le *Bacillus cellulosa dissolvens* n'a pas proliféré. Il n'attaque donc que la cellulose, les autres hydrates ne pouvant lui servir de source de carbone. Même en présence de cellulose il ne les fait pas fermenter : du glucose ajouté à notre milieu de culture ordinaire est resté intact tandis que le papier a été désagrégré.

Recherche d'une cellulase.

Nous ne connaissons que les recherches de Pringsheim sur les cellulases microbiennes et celles qui ont pour but de mettre en évidence autour des colonies une zone claire due à la sécrétion d'une enzyme par les bactéries aérobies.

Pringsheim n'a pas trouvé de diastases dans ses milieux de culture. Selon lui, la cellulase microbienne est un endoferment et les bactéries cellulosiques sécrètent non seulement une cellulase, mais une cellobiase, car il a pu préparer les osazones du cellobiose et du glucose formés pendant la fermentation. Mais ses recherches, pour n'avoir pas été faites avec des espèces pures, mais avec un mélange de bactéries pouvant sécréter diverses diastases, n'ont qu'une valeur relative.

Comme il nous a été impossible de constater la plus petite zone claire (là où le papier est attaqué, on trouve des microbes), nous avons recherché une cellulase dans la solution nutritive. Pour tuer le *Bacillus cellulosa dissolvens*, la chloropicrine nous a servi d'antiseptique. Elle présente pour nous deux avantages : celui de n'avoir aucune action sur les enzymes, et, par

sa solubilité dans l'eau, de baigner tous les débris de papier imprégnés de microbes.

Nous avons opéré ainsi : nous avons préparé une culture avec 1 gramme de cellulose et 100 cent. cubes de liquide nutritif. Lorsque le papier était entièrement jaune orange et la fermentation très active, nous avons saturé le liquide avec de la chloropicrine. Nous avons fait des prises d'essai trois, cinq et dix jours après. Nous avons prélevé stérilement 30 cent. cubes de liquide ainsi que des débris de papier. Nous avons centrifugé dix minutes dans des tubes stériles pour débarrasser la solution des fibrilles et des microbes. Après décantation du liquide qui surnage, nous avons lavé le résidu avec de l'eau physiologique et nous avons centrifugé de nouveau durant dix minutes. Une fois l'eau physiologique décantée nous avons un liquide dans lequel on pouvait rechercher une cellulase soluble, et des débris de papier imprégnés de microbes à morphologie inchangée par la chloropicrine. Lorsque le *Bacillus cellulosæ dissolvens* était tué par la chloropicrine, ces débris de papier ne donnaient plus de cultures. Il nous ont donc servi de témoins.

Avec les liquides centrifugés et les résidus de fermentation nous avons fait les expériences suivantes :

1° Nous avons plongé un fragment de papier stérile dans 5 cent. cubes de liquide centrifugé et nous avons ajouté 1 cent. cube de toluène.

2° Nous avons additionné à 5 cent. cubes de milieu ordinaire 5 cent. cubes de liquide centrifugé et dans certains tubes nous avons fait le vide pour nous rapprocher des conditions habituelles de culture. Chaque tube contenait du toluène.

3° Nous avons ajouté des résidus de fermentation au milieu de culture habituel dans des conditions aérobies et anaérobies. Les tubes aérobies contenaient du toluène, les tubes anaérobies nous servaient de témoins.

Le *Bacillus cellulosæ dissolvens* n'est tué par la chloropicrine qu'après dix jours. Dans les cultures anaérobies faites avec les débris de papier qui ont subi pendant trois et cinq jours l'action de la chloropicrine, le *Bacillus cellulosæ dissolvens* se développe encore. Le morceau de papier devient jaune orange, il y a formation de gaz, et par un examen microscopique on s'aperçoit que les fibrilles sont recouvertes de bacilles. Après dix jours

on n'a plus de fermentation, mais dans aucun tube, aérobie ou anaérobie, on ne voit d'action diastasique sur la cellulose.

La cellulase sécrétée par le *Bacillus cellulosæ dissolvens* ne diffuse pas dans les liquides de culture, c'est un endo-ferment qui n'agit que lorsque le microbe vivant adhère à la cellulose elle-même.

Pouvoir pathogène.

Afin d'éviter l'injection de carbonate de calcium à l'animal, nous préparons des cultures en milieu non carbonaté. Vingt-quatre heures après le début de la fermentation, le tube est agité vigoureusement pour dilacérer le papier en fibrilles et le mettre en suspension. Nous injectons 3 cent. cubes du liquide agité dans la cuisse d'un cobaye de 300 grammes. L'animal réagit très peu. Au point d'inoculation on ne voit qu'une légère induration qui disparaît en quelques jours.

Le *Bacillus cellulosæ dissolvens* n'est donc pas pathogène. Ce qui le caractérise, c'est son action spécifique sur la cellulose.

CHAPITRE III

CARACTÉRISATION ET DOSAGE DES PRODUITS DE DÉCOMPOSITION DE LA CELLULOSE PAR LE *BACILLUS CELLULOSÆ DISSOLVENS*

Nous conservons pour les dosages notre milieu nutritif contenant de l'extrait fécal, parce qu'il est le plus favorable au développement du *Bacillus cellulosæ dissolvens*. Mais nous y ajoutons une quantité exactement connue de cellulose. Nous n'incorporons jamais plus de 1 p. 100 de cellulose desséchée à 100° afin que les produits solubles de fermentation ne modifient pas, de manière sensible, la composition du milieu de culture.

Nous nous servons de ballons munis d'un robinet à vide dont le volume est égal à deux fois et demie le volume du liquide qu'ils doivent contenir. Le vide étant fait dans ces ballons de telle manière que la pression d'air ne dépasse pas 2 à 4 millimètres de mercure, les gaz de la fermentation ne sont jamais à une pression supérieure à la pression atmosphérique, ce dont

nous nous assurons d'ailleurs au moment de l'analyse des gaz. Cela nous est une preuve que pendant la fermentation il n'y a pas eu de rentrée d'air, ni de perte de gaz.

Nous avons réalisé une dizaine de fermentations avec des quantités différentes de cellulose. A certaines d'entre elles nous n'avons pas ajouté de carbonate de calcium. Quelques cultures ont été faites en vue de recueillir tous les produits de fermentation et d'établir un bilan, d'autres afin d'obtenir les produits solubles pour en déterminer exactement la nature.

Nous donnerons deux analyses. La première est faite avec une culture ne contenant pas de carbonate de calcium, et l'autre avec une culture en contenant.

Les résultats de la première ne sont pas très favorables, car la quantité de cellulose dissoute est faible et, par conséquent, la détermination exacte de tous les produits est très difficile.

Elle présente cependant un certain intérêt. On voit en effet, en comparant les résultats qu'elle donne à ceux de la deuxième analyse, qu'il disparaît deux fois et demie moins de cellulose dans les cultures qui ne contiennent pas de carbonate de calcium que dans celles qui en contiennent, et que le rapport des gaz et le rapport des acides varie peu dans l'une et dans l'autre.

PREMIÈRE ANALYSE.

On prend 1 gramme de cellulose séchée à 100° et 100 cent. cubes de solution nutritive sans carbonate de calcium. La fermentation commence après six jours et dure dix jours. Le papier devient jaune orange, le dégagement gazeux est régulier et ne commence à diminuer que deux jours avant l'arrêt de la fermentation. Six jours après cet arrêt on extrait les gaz. Comme la culture a été faite sans carbonate de calcium, on ne trouvera évidemment que les gaz qui proviennent de la fermentation cellulosique.

Analyse des gaz :

Température du mercure	14°3
Pression atmosphérique	752 mm. 5
Volume du gaz recueilli.	26 c. c. 4

Recherche du gaz carbonique :

Prise d'essai	18 c. c. 6
KOH + H ² O	9 c. c. 85
	8 c. c. 75
	ou 47,04 p. 100 de CO ²
Pyrogallol (pas d'oxygène)	8 c. c. 75

Analyse eudiométrique :

Prise d'essai	2 c. c. 93
Oxygène	12 c. c. 3
	15 c. c. 23
Après combustion	11 c. c. 2
Après contraction	4 c. c. 03

La contraction correspond à 2 c.c. 59 d'hydrogène. Il reste 0 c.c. 24 de gaz non déterminé qui est probablement de l'azote, car, après avoir ajouté de l'eau et de la potasse, le volume ne diminue pas. Il ne s'est donc pas formé de gaz carbonique pendant la fermentation.

Dans cette analyse il y a 91,8 p. 100 d'hydrogène, soit pour les gaz retirés du ballon, 48,51 p. 100.

Une deuxième analyse eudiométrique nous a donné 48,16 p. 100 d'hydrogène, soit en moyenne 48,33 p. 100.

Les 26 c.c. 4 de gaz recueillis sont donc formés de :

47,04 p. 100 de gaz carbonique, soit 12 c.c. 41.

48,33 p. 100 d'hydrogène, soit 12 c.c. 75.

4,63 p. 100 d'azote qui provient de l'air atmosphérique laissé dans le ballon.

Le poids des 12 c.c. 41 de gaz carbonique est :

$$1,293.d.\frac{H}{760}\frac{V}{1+\alpha t}=1,293.1,529.\frac{752,5}{760}.\frac{12,41}{1+\frac{14,5}{273}}=0\text{ gr. }023.$$

La même formule donne pour l'hydrogène 0 gr. 001.

Il nous reste maintenant à déterminer le poids du résidu de fermentation, à étudier le pigment jaune et à faire l'analyse des aldéhydes, des alcools et des acides éventuels.

Poids du résidu de fermentation : On filtre le liquide de culture sur un filtre séché à 100° et taré. Le liquide est mis de côté pour les opérations suivantes. Il est parfaitement limpide et ne contient pas de corps microbiens en suspension. Ces derniers sont pesés avec le résidu de fermentation.

Le résidu est lavé à l'eau, puis, pour dissoudre le pigment, à l'alcool à 95°. On le sèche à 100° et on le pèse.

Tare du filtre	0 gr. 701
+ résidu.	1 gr. 526
Poids du résidu de fermentation.	0 gr. 825

Pendant la fermentation il a disparu :

$$1\text{ gramme} - 0,825 = 0\text{ gr. }175\text{ ou }17,5\text{ p. }100.$$

Pigment : L'alcool coloré en jaune par le pigment a été évaporé dans le vide, mais à la fin de l'évaporation le pigment était décomposé et nous n'avons retrouvé que des traces d'une poudre blanchâtre avec laquelle il était impossible de faire des réactions.

Analyse des produits solubles dans l'eau : Le liquide de culture filtré est acide au tournesol : 10 cent. cubes sont neutralisés en pré-

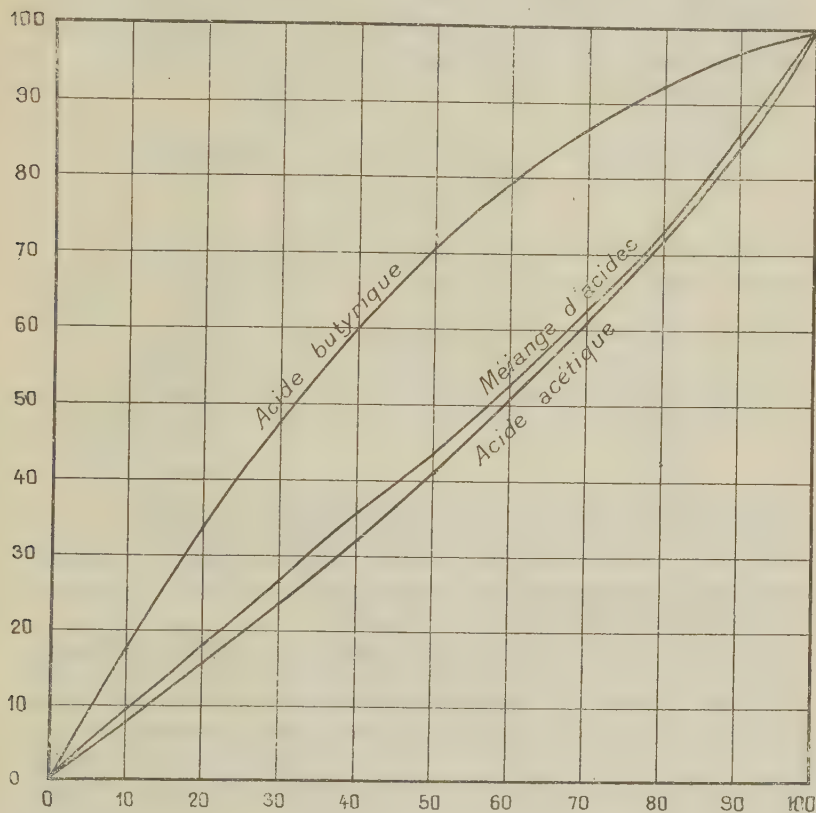


FIG. 7.

sence de phtaléine par 1 c. c. 2 de lessive de soude N/10. Il ne réduit pas le réactif cupro-potassique.

Produits volatils non acides : Le liquide est neutralisé et distillé. On recueille les 25 premiers cent. cubes qui sont redistillés afin d'obtenir 10 cent. cubes riches en produits volatils. 1 cent. cube de ce distillat réduit le bichromate sulfurique et la teinte obtenue est celle que donnent dans les mêmes conditions 2 cent. cubes de solution d'alcool éthylique au millième.

Il y a donc dans les 10 cent. cubes, à supposer qu'il ne s'y trouve pas

d'autre réducteur que l'alcool éthylique, 2 centigrammes de cet alcool, quantité trop faible pour se prêter à la recherche d'autres corps volatils.

Acides volatils : Le résidu de distillation en milieu neutre est acidifié par de l'acide tartrique en léger excès. On amène son volume à 110 cent. cubes et on opère selon les indications de Duclaux pour la recherche et le dosage des acides volatils. Chacune des prises de 10 cent. cubes est neutralisée par de l'eau de chaux saturée, en présence de phtaléine. Il faut 28 c.c. 8 de cette eau de chaux pour neutraliser 10 cent. cubes d'acide sulfurique N/10.

Voici les chiffres obtenus :

PRISES D'ESSAI en centimètres cubes	EAU DE CHAUX en centimètres cubes	ACIDES DISTILLÉS p. 100
10	2,8	9,7
20	5,2	18
30	7,6	26,7
40	10,2	35,4
50	12,4	43,05
60	15,2	52,7
70	18	62,5
80	21	72,9
90	24,8	86
100	28,8	100

Ces chiffres permettent de construire la courbe ci-dessus.

On voit qu'elle est comprise entre celles des acides acétique et butyrique, et comme, de plus, l'odeur butyrique est très nette au début de la distillation, il est évident qu'on se trouve en présence d'un mélange d'acides acétique et butyrique.

Par l'étude des tables de Duclaux (après les avoir préalablement complétées) on peut connaître la proportion dans laquelle sont mélangés ces acides. Au début de la distillation (30, 40 cent. cubes) on a une partie d'acide butyrique pour sept parties d'acide acétique; à la fin de la distillation (50, 60, 70 cent. cubes) une partie d'acide butyrique pour onze parties d'acide acétique; la moyenne est donc de 1 p. 9,2.

Les 28 c.c. 8 d'eau de chaux employés à neutraliser les acides volatils représentent 1 c.c. 063 d'acide N/10. Si, pour faciliter les calculs, on suppose qu'on n'a que de l'acide acétique, l'erreur faite ainsi étant négligeable, on obtient, après les corrections indiquées par Duclaux, 0 gr. 008 d'acide acétique.

BILAN DE FERMENTATION

Poids de cellulose disparue pendant la fermentation. 0 gr. 175

Poids des corps retrouvés par l'analyse :

Gaz carbonique	0 gr. 023
Hydrogène	0 gr. 004
Alcool	0 gr. 02
Acide.	0 gr. 008
Total.	0 gr. 052
	ou 29,71 p. 100

DEUXIÈME ANALYSE.

3 grammes de cellulose sont mis en fermentation dans 300 cent. cubes de solution nutritive additionnée de 0 gr. 60 de carbonate de calcium.

La fermentation a duré dix-neuf jours. Le ballon a été agité matin et soir pour que le milieu conserve sa réaction neutre.

La coloration brun foncé du liquide s'est éclaircie. A la fin de la fermentation on voit au fond du ballon un précipité fortement coloré.

Analyse des gaz :

Pression atmosphérique	750 mm.
Température du mercure.	25°

On recueille 290 cent. cubes de gaz composés de 56,4 p. 100 de gaz carbonique, soit 162 c. c. 69 et de 36,11 p. 100 d'hydrogène, soit 104 c. c. 71. On a un résidu de 7,7 p. 100 d'azote.

162 c. c. 69 de gaz carbonique pèsent	0 gr. 2907
104 c. c. 71 d'hydrogène pèsent.	0 gr. 0085

Poids du résidu de fermentation : Le résidu de fermentation est non seulement lavé à l'eau et à l'alcool, mais à l'acide chlorhydrique à 10 p. 100 pour dissoudre l'excès de carbonate de calcium ainsi que le précipité brun foncé. On termine par des lavages à l'eau jusqu'à ce que la réaction du chlore disparaisse.

Tare du filtre.	0 gr. 702
+ résidu.	2 gr. 690
Poids du résidu de fermentation.	1 gr. 988

Pendant la fermentation il a disparu :

3 grammes — 1 gr. 988 = 1 gr. 012 ou 33,7 p. 100
soit 2,5 fois plus qu'en l'absence de carbonate de calcium.

Pigment : L'alcool est distillé dans le vide. Malgré la rapidité de l'opération, le pigment s'est décomposé en grande partie. On reprend par quelques centimètres cubes d'alcool les quelques gouttes huileuses, brunâtres, qui se trouvent au fond du ballon. L'alcool est évaporé dans le vide et on pèse le résidu. On trouve 13 milligr. 5 de pigment, poids évidemment très inférieur au poids réel.

Ce pigment est soluble dans l'alcool, le chloroforme, l'éther, le sulfure de carbone, la benzine et l'acétone. Il les colore en jaune.

Analyse des produits solubles dans l'eau : Le liquide de culture est neutre au tournesol et ne réduit pas le réactif cupro-potassique.

Produits volatils non acides : On distille 100 cent. cubes du liquide de culture. Le distillat exhale une odeur nauséabonde de matières organiques en décomposition et il est légèrement alcalin au tournesol. On le redistille après addition de quelques gouttes d'acide sulfurique et on recueille 37 cent. cubes qui contiennent, en supposant que c'est uniquement de l'alcool éthylique, 0 gr. 082 d'un corps volatil qui réduit le bichromate sulfurique et donne avec le chlorure de benzoyle du benzoate d'éthyle.

Acides volatils : Avant de rechercher les acides volatils on alcalinise légèrement le liquide et on le débarrasse de tout corps réducteur, par un entraînement à la vapeur d'eau. On l'acidifie ensuite par un léger excès d'acide tartrique. On laisse déposer les sels de calcium et on filtre. On a alors 200 cent. cubes de liquide. On en prend 100 cent. cubes qu'on amène au volume de 110 cent. et on opère suivant la méthode de Duclaux.

24 cent. cubes de l'eau dont on se sert neutralisent 10 cent. cubes d'acide sulfurique N/10.

Voici les chiffres qu'on obtient :

PRISES D'ESSAI en centimètres cubes	EAU DE CHAUX en centimètres cubes	ACIDES DISTILLÉS p. 100
10	3,9	8
20	8	16,4
30	12,2	25,1
40	16,6	34,2
50	21,1	43,5
60	25,7	52,9
70	30,6	63
80	36	74,2
90	41,9	86,4
100	48,5	100

Il faut doubler la quantité d'eau de chaux employée à la neutralisation des acides, puisqu'on a 200 cent. cubes de liquide. Cela nous donne 97 cent. cubes d'eau de chaux.

On peut avec les chiffres trouvés construire la courbe ci-contre. A l'aide des tables de Duclaux, on peut conclure de ces analyses

qu'on se trouve en présence d'un mélange de 1 partie d'acide butyrique et de 10 parties d'acide acétique.

Les 97 cent. cubes d'eau de chaux nécessaires pour saturer les acides se répartissent donc de la manière suivante :

8 c. c. 80 pour l'acide butyrique, soit après correction, 9 cent. cubes
88 c. c. 20 pour l'acide acétique, soit après correction 100 cent. cubes

Poids d'acide acétique	0 gr. 275
Poids d'acide butyrique.	0 gr. 033
Poids du gaz carbonique dégagé par l'acide acétique . .	0 gr. 10
Poids du gaz carbonique dégagé par l'acide butyrique. .	0 gr. 008
Total	0 gr. 108

Poids du gaz carbonique produit par la décomposition de la cellulose :

$$0 \text{ gr. } 2907 - 0 \text{ gr. } 108 = 0 \text{ gr. } 1827.$$

BILAN DE FERMENTATION

en grammes

BILAN DE CARBONE

en grammes

Poids de cellulose disparue pendant la fermentation.	1,012	contenant	0,400
--	-------	-----------	-------

Poids des corps retrouvés par l'analyse :

Acide acétique.	0,275	contenant	0,110
Acide butyrique	0,033	—	0,018
Alcool éthylique	0,082	—	0,0428
Gaz carbonique	0,1827	—	0,0498
Hydrogène	0,0085		»
Pigment.	0,0135		»
	0,5947		0,2206

ou 58,76 p. 100

ou 55,15 p. 100

Les autres analyses que nous avons faites ne nous ont pas donné de meilleurs résultats. Les produits volatils ne représentent pas plus de 55 p. 100 du carbone disparu pendant la fermentation. Les autres 45 p. 100 ne sont pas faciles à retrouver. Une grande partie du pigment étant décomposée pendant son extraction, on ne connaît ni son poids exact, ni sa teneur en carbone, mais le pigment ne représente, à lui seul, que quelques centièmes du carbone manquant. La nature et le poids des corps volatils alcalins et du précipité brun foncé n'ayant pas été déterminés, il se peut qu'ils contiennent du carbone provenant de la cellulose. Mais la quantité de carbone qu'on pourrait ainsi retrouver est évidemment très faible et ne suffit pas à expli-

quer pourquoi on ne retrouve que 55 p. 100 du carbone mis en fermentation. A cause de cela, nous avons pensé que la partie du carbone non retrouvée pouvait être engagée dans des corps solubles non volatils tels que l'acide lactique ou des produits d'hydrolyse intermédiaires entre le cellose et la cellulose,

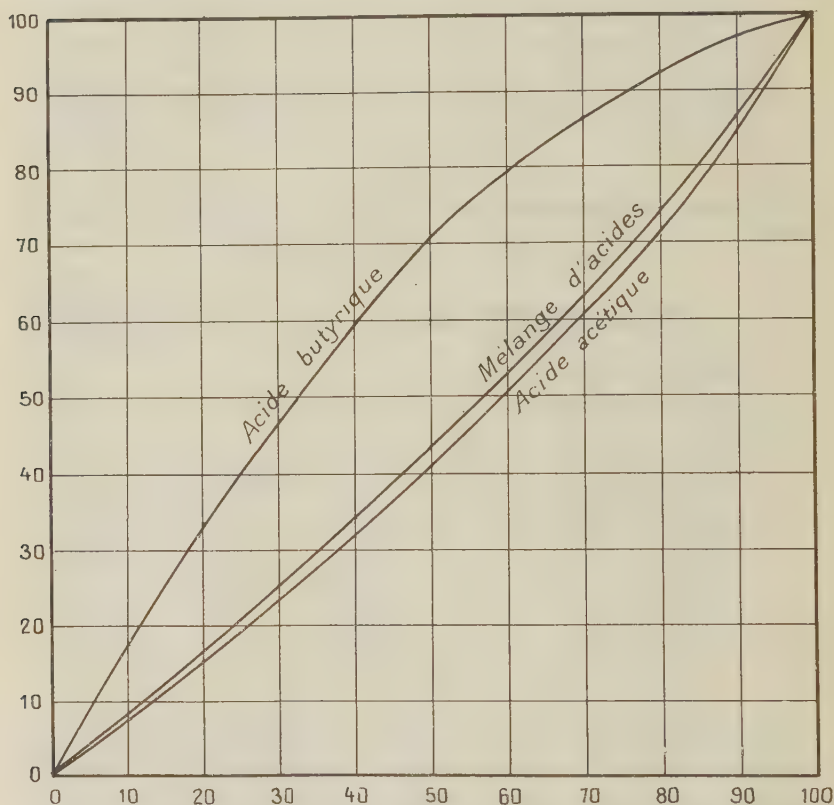


FIG. 8.

puisque le liquide de fermentation ne réduit pas la liqueur cupro-potassique. C'est pourquoi nous avons fait les recherches suivantes :

RECHERCHE DE L'ACIDE LACTIQUE : Le liquide de fermentation débarrassé des acides volatils est concentré et agité avec de l'éther saturé d'eau. L'éther est acide au tournesol et donne, avec l'acide sulfurique et la solution alcoolique de codéine à 5 p. 100, la coloration brune

qui caractérise l'acide lactique. Mais il n'est pas possible de faire cristalliser du lactate de zinc. L'acide lactique n'existe donc qu'à l'état de traces.

RECHERCHE DES PRODUITS D'HYDROLYSE DE LA CELLULOSE : Nous avons pensé que ces corps, solubles dans les milieux de culture, seraient précipités par l'alcool et qu'en les transformant ensuite en sucre réducteur il nous serait possible de les identifier.

On évapore jusqu'à consistance sirupeuse 1.000 cent. cubes de liquide de fermentation débarrassé des produits volatils. Le phosphate de potassium et le chlorure de sodium cristallisent en partie. On filtre et on additionne le filtrat d'une quantité suffisante d'alcool à 95° pour obtenir un liquide alcoolique à 60°. Il se forme un précipité qui pèse 0 gr. 30 et contient 0 gr. 084 de matière organique. Le précipité est soumis à l'hydrolyse par de l'acide chlorhydrique à 10 p. 100, pendant dix heures, dans un bain-marie bouillant. Après ce temps, on trouve 1 milligramme de sucre réducteur. Cette quantité est très faible, il n'existe donc que des traces de produits d'hydrolyse précipitables par l'alcool, qui ne représentent pas les 45 p. 100 de carbone manquants dans l'analyse faite sur 300 cent. cubes de liquide.

Nous pensons qu'il doit exister des saccharides solubles dans l'alcool, saccharides qui sont probablement assimilables par l'organisme. Le *Bacillus cellulosæ dissolvens* jouerait, de ce fait, un rôle très important dans la digestion de la cellulose, puisqu'il donnerait ainsi non seulement des acides assimilables, mais des saccharides également assimilables. Nous n'avons pu déceler ceux-ci parce que nous avons opéré sur des quantités de liquide trop faibles. Comme il est très difficile de retrouver ces saccharides dans un milieu de culture complexe, nous nous proposons de les rechercher, en faisant fermenter plusieurs centaines de grammes de cellulose.

Nous exposerons maintenant quelques recherches faites sur la solution alcoolique de pigment, sur les corps volatils en milieu neutre et sur les acides volatils, en faisant remarquer que pour ces derniers nous n'avons jamais trouvé plus d'une partie d'acide butyrique pour 9,2 parties d'acide acétique et que souvent même la quantité d'acide butyrique était beaucoup plus faible.

RÉACTIONS DE LA SOLUTION ALCOOLIQUE DE PIGMENT :

Quelques centimètres cubes sont traités	par NaOH	Précipité blanchâtre.
—	à chaud par NH ³	0
—	par HCl	La couleur devient un peu plus accentuée.
—	par SO ³ H ⁺	La couleur devient un peu plus accentuée.
—	par NO ² H	Couleur rose sale.
—	par I + KI	0
—	par Fe ² Cl ⁶	Couleur brune assez foncée.

DÉTERMINATION DE LA NATURE DES CORPS VOLATILS EN MILIEU NEUTRE :

On réunit les distillats en milieu neutre provenant de plusieurs fermentations, et on les rectifie. On obtient plusieurs centimètres cubes de liquide dont on sépare l'eau par du carbonate de potassium sec et pulvérisé. On obtient environ 2 centimètres et demi d'un corps dont on prend la densité et le point d'ébullition.

Densité	0,815
Point d'ébullition.	78-80°

Quelques gouttes sont oxydées par le bichromate de potassium et l'acide sulfurique. On obtient par distillation un acide qui donne les réactions de l'acide acétique : précipité avec le nitrate d'argent et coloration rouge avec le perchlorure de fer.

Tous ces caractères permettent de conclure que le corps étudié est de l'alcool éthylique. Il ne contient pas d'aldéhydes, car il ne réduit pas la liqueur cupro-potassique, le nitrate d'argent ammoniacal et ne recolore pas le réactif de Schiff.

DÉTERMINATION DE LA NATURE ET DOSAGE DES CORPS VOLATILS EN MILIEU ACIDE : On réunit les distillats en milieu acide provenant de plusieurs fermentations.

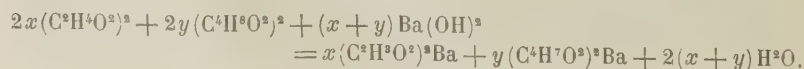
Une partie, neutralisée par de la lessive de soude, est concentrée. Elle donne les réactions de l'acide acétique et la réaction d'Aguhlon qui caractérise l'acide butyrique.

Une autre partie est neutralisée par de l'eau de baryte. On fait cristalliser les sels de baryum. On les sèche, on les reprend par l'eau et on les fait cristalliser à nouveau.

On prend 0 gr. 25 du mélange de sels de baryum. On précipite le baryum par de l'acide sulfurique :

On obtient 0 gr. 223 qui contiennent 0 gr. 131 de baryum.

Ne connaissant ni le poids d'acide acétique ni le poids d'acide butyrique qui ont formé les 0 gr. 25 d'acétate et de butyrate de baryum, on peut écrire la réaction sous la forme suivante :



On a pour déterminer x et y les deux données 0,25 et 0,131.

On trouve que le rapport en poids de $\frac{x}{y}$ est égal à $\frac{8}{1}$ et que le rapport en volume est égal à $\frac{11,8}{1}$.

Les chiffres de l'analyse pondérale sont donc voisins de ceux fournis par la distillation suivant la méthode de Duclaux.

Nous indiquerons, enfin, qu'une de nos cultures ayant été contaminée, nous avons vu disparaître en trente-six jours 90,87 p. 100 des 10 grammes de cellulose mis en fermentation. Si on se rappelle que dans les cultures pures il disparaît en dix-neuf jours 1 gramme environ de cellulose, on voit que dans les cultures impures il en disparaît cinq fois plus. Le pigment est décomposé par la flore associée au fur et à mesure de sa formation, ce qui permet au *Bacillus cellulose dissolvens* de continuer à vivre sur la fibre cellulosique.

Nous n'avons pas réussi à isoler les espèces qui permettent au *Bacillus cellulose dissolvens* d'exercer ainsi son action spécifique sur la cellulose. Mais nous croyons intéressant de signaler ce phénomène. Il explique pourquoi, dans les premières cultures, le papier ne présente pas toujours la coloration jaune orange si caractéristique. Il nous donne lieu de croire aussi qu'une grande quantité de cellulose est décomposée rapidement dans le tube digestif par les associations microbiennes, les produits de fermentations cellulosiques servant d'aliments à d'autres bactéries.

On a, du reste, déjà signalé l'importance du rôle joué par la cellulose dans la fixation d'azote et dans la formation d'ammoniaque par les bactéries du sol. Nous ne citerons que les expériences faites avec des associations d'espèces pures. M. Beth constate que les *Azotobacters* fixent de l'azote quand on ne leur donne que de la cellulose comme source d'hydrate de carbone et qu'on les associe au *Bacillus rossicus*, aux *Bacterium fimi* et *flavigenum*. Pour Hutchinson et Clayton le mucilage pectique formé par le *Spirochæta cytophaga* peut servir de source de carbone aux bactéries nitrifiantes. Enfin Groenewege étudie l'action des bactéries dénitrifiantes vivant en symbiose avec les *Bacillus cellaresolvens* α , β et γ .

CONCLUSIONS

Il ressort des travaux faits antérieurement que la cellulose est désagrégée non seulement dans le tube digestif des animaux, mais encore dans celui de l'homme, et qu'en particulier chez ce dernier la cellulose des légumes tendres tels que la carotte et le chou blanc disparaît presque intégralement.

La cause de cette dissolution doit être attribuée à des micro-organismes dont aucune espèce jusqu'à présent n'avait été isolée de la flore intestinale de l'homme.

Nous avons réussi à isoler une espèce anaérobie stricte, le *Bacillus cellulosa dissolvens*, n. sp. dans 60 p. 100 des cas étudiés.

Cette espèce est difficile à cultiver. Elle ne pousse normalement que dans les milieux où elle trouve une source d'azote très dégradée comme celle que contient un extrait de matières fécales. Elle est très résistante à la chaleur. Sa spore n'est tuée qu'après avoir été maintenue quarante-cinq à cinquante minutes à l'ébullition et résiste dix jours à l'action de la chloropicrine à saturation (0,16 p. 100).

Parmi les produits de désagrégation de la cellulose, nous avons trouvé du gaz carbonique, de l'hydrogène, de l'alcool éthylique, des acides acétique et butyrique et un pigment jaune, lesquels ne représentent que 60 p. 100 environ de la cellulose mise en fermentation. Nous avons pu déceler aussi des traces d'acide lactique et de produits d'hydrolyse précipitables par l'alcool. Enfin, il doit exister des saccharides solubles dans l'alcool que nous nous proposons de déterminer dans des recherches ultérieures.

On peut attribuer au *Bacillus cellulosa dissolvens*, qui, dans le milieu intestinal, est dans d'excellentes conditions de culture, un rôle important dans la digestion de la cellulose. En effet, on observe qu'à l'état pur, il désagrège, en seize jours, 1 gramme environ de cellulose, tandis qu'il en désagrège 5 fois plus lorsqu'il est en association avec d'autres espèces microbiennes. Comme, évidemment, c'est le cas dans le tube digestif, où la flore intestinale est des plus riches, il y désagrège rapidement, selon toute vraisemblance, la cellulose des aliments ingérés.

RECHERCHES EXPÉRIMENTALES

SUR LE NEUROTROPISME DU VIRUS HERPÉTIQUE

par G. MARINESCO et STATE DRAGANESCO.

La transmission du virus d'herpès fébrile à la cornée du lapin, démontrée par Grüter et confirmée par les recherches ultérieures de Læwenstein, Doerr et Schnabel, Blanc et Caminopetros, Levaditi, Harvier et Nicolau, Luger et Lauda, Kling, De Arric, Marinesco et Draganesco, a ouvert une voie nouvelle à l'étude des virus invisibles. En effet, par la facilité avec laquelle on peut se procurer le virus herpétique et le transmettre au lapin, par son maniement commode et par la réceptivité de l'organisme de cet animal à son égard, on peut varier à l'infini la porte d'entrée et analyser ses localisations dans le système nerveux central. Nous nous proposons, dans ce travail, d'étudier surtout certains problèmes de neurotropisme, qui n'ont pas attiré suffisamment l'attention des auteurs précédents et qui nous permettent de mieux comprendre la signification de ce neurotropisme.

1

Donnons tout d'abord les résultats de nos observations au point de vue de la symptomatologie et des lésions.

I. — *Lapin A*, inoculé par scarification du limbe cornéo-conjonctival du côté droit, avec le virus provenant d'un sujet atteint d'herpès labial fébrile récidivant, pris le troisième jour après le début de l'éruption. Le lendemain, on constate au niveau de l'inoculation une kérato-conjonctivite qui progresse quotidiennement et atteint le maximum le cinquième jour. L'inflammation diminue ensuite progressivement mais, le dixième jour, l'animal a une fièvre élevée (40°2), il est abattu et présente des parésies du train postérieur et antérieur. Le douzième jour, après l'inoculation, l'état général s'améliore de même que l'état local, mais il reste une opacité cornéenne.

II. — *Lapin B*, inoculé par scarification de la cornée droite, avec le matériel d'herpès cutané récidivant d'un sujet atteint de paralysie générale progressive. Le lendemain de l'inoculation il apparaît une kérato-conjoncti-

vite intense qui atteint son maximum le septième jour. Le treizième jour, la suppuration locale diminue, mais le chémosis et l'infiltration de la cornée existent encore. Alors il apparaît des troubles nerveux très graves (phénomènes parétiques des membres, plus accusés à droite, des troubles bulbaires et cérébelleux). L'animal reste toujours dans le décubitus latéral droit et, lorsque nous essayons de le remettre sur le côté gauche, il revient toujours dans l'attitude antérieure. Il y a comme une espèce de mouvement de manège dans le sens de l'axe longitudinal du corps. L'animal succombe le quinzième jour avec troubles de déglutition et de respiration. On fait des passages, avec de l'émulsion du cerveau, aux lapins suivants :

1° *Lapin B¹*, inoculé sous la dure-mère, la cornée droite et le prépuce. Le troisième jour, nous constatons une conjonctivite légère qui disparaît rapidement. L'animal succombe le cinquième jour, après avoir présenté un abattement et un état général mauvais.

2° *Lapin B²*, inoculé aux mêmes régions que chez le précédent. Le quatrième jour légère conjonctivite. L'état général est bon jusqu'au quatorzième jour; à ce moment l'animal est abattu et présente un mouvement de manège, vers la gauche. Il succombe le treizième jour avec des crises tétaniques, myoclonies, spasmes du diaphragme, parésies.

3° *Lapin B³*, inoculation par scarification de la cornée et de la muqueuse de la vulve avec du virus de l'émulsion cérébrale du lapin B, au niveau du limbe de la conjonctive. Réaction inflammatoire au cinquième jour, fièvre et état général mauvais.

4° L'inoculation de la cornée chez deux *petits chats* est restée sans résultats.

III. — *Lapin C*. Mêmes inoculations que celle du lapin B, de la même souche. Le septième jour kérato-conjonctivite intense, progressive, intéressant toute la cornée. Le treizième jour il apparaît des phénomènes de manège, l'animal tourne toujours du côté gauche, vers le côté droit, c'est-à-dire vers l'endroit de l'inoculation. Ce sont là des troubles d'équilibre, très caractéristiques. L'animal succombe le treizième jour. On fait une émulsion du cerveau qu'on inocule à la cornée gauche du lapin A et du lapin B¹, inoculation suivie d'une kérato-conjonctivite passagère.

IV. — *Lapin D*, inoculé avec de la sécrétion conjonctivale du lapin B au niveau de la cornée droite et du prépuce. L'animal fait une kérato-conjonctivite assez intense et présente la tendance aux mouvements de manège.

V. — *Lapin E*, inoculé dans le limbe conjonctivo-cornéen droit avec le produit de racle des vésicules d'herpès inguinal d'un malade atteint de paralysie générale progressive. Le quatrième jour, kérato-conjonctivite intense. Le huitième jour l'animal est abattu et tourne seulement du côté droit; le dixième jour il a une paralysie du train postérieur et de l'incontinence d'urine et des matières fécales, ainsi que des troubles respiratoires (accélération, irrégularité du rythme). La température n'a pas dépassé 39°2. La kérato-conjonctivite est très intense, mais la sécrétion a presque cessé. La cornée est anesthésique. Il succombe le onzième jour, avec des crises tétaniques.

VI. — *Lapin F*. Inoculation dans la cornée droite avec le produit herpétique du même malade. Le cinquième jour la kérato-conjonctivite est déjà très intense. Le lapin tient la tête tournée du côté droit. Le neuvième jour il a des mouvements de manège vers la partie inoculée. Le dixième jour

l'animal tient la tête et même le tronc inclinés du côté droit. Le onzième jour il apparaît une parésie du train antérieur et du train postérieur, il a des myoclonies et aussi des troubles respiratoires. Le douzième jour il reste étendu sur le côté malade seulement, en opisthotonos prononcé. Si on le met sur le côté gauche il pousse des cris et renverse aussitôt la tête en arrière et vers le côté droit. Quand on l'excite il présente des mouvements de roulement autour de son axe longitudinal.

Sacrifié le treizième jour, quand l'animal avait des troubles bulbaires graves. Il est à remarquer que cet animal a eu, tout le temps, une fièvre élevée allant jusqu'à 40°8. Elle a surtout duré jusqu'au onzième jour.

VII. — *Lapin G*, inoculé dans le ganglion plexiforme et le tronc commun vago-sympathique du côté droit, avec émulsion du système nerveux du lapin B^a. Il commence, le troisième jour, à avoir un peu de fièvre (39°2), qui atteint, le huitième jour, le maximum (40°2). Alors il présente aussi des mouvements de manège à droite, de l'abattement, des troubles respiratoires légers. L'état s'aggrave, malgré que la température baisse, et l'animal meurt le douzième jour.

Avec des fragments du système nerveux nous faisons une émulsion, avec laquelle on injecte le lapin G¹ dans le médian et crural et le lapin G² dans le sciatique gauche.

VIII. — *Lapine H*. Injection, dans le nerf sciatique droit, de la même émulsion que le précédent. Le septième jour on constate une parésie du membre injecté. L'animal, le cinquième jour, a 39°5; le neuvième jour paralysie du train postérieur, avec des troubles sphinctériens, qui s'accroissent les jours suivants. Le douzième jour l'animal succombe avec des troubles bulbaires graves (respiratoires, de déglutition, etc.). La température était revenue à peu près à la normale. Deux jours avant la mort, cette lapine a avorté plusieurs fœtus morts.

IX. — *Cobaye*, inoculé dans le sciatique poplité externe droit de 3-4 gouttes d'une émulsion de centres nerveux du lapin B^a. Le onzième jour il a présenté une paralysie de la patte postérieure droite à laquelle s'ajoute, le lendemain, une paralysie légère de la patte gauche. Cette paralysie s'améliore le jour suivant et l'animal succombe, subitement, le quinzième jour.

Nous passons à présent aux lésions histologiques que nous avons constatées chez nos lapins.

Nous devons ajouter que nous avons pratiqué, dans presque tous les cas, une analyse minutieuse de tout le système nerveux, à partir de l'endroit d'inoculation, et nous avons suivi la marche du virus à travers les différentes régions du névraxe. Cette étude, comme on le verra, nous a permis de constater des faits nouveaux de nature à apporter une certaine lumière dans le problème du neurotropisme et de la névrite ascendante. Nous commencerons la description des lésions par le lapin B, inoculé, comme on l'a vu, dans la cornée droite et mort le quinzième jour après l'opération.

LAPIN B. — SCARIFICATION A LA CORNÉE DROITE.

Cerveau (hippocampe). — Infiltration méningée modérée par des mononucléaires. Le long des vaisseaux qui pénètrent dans l'écorce il y a des petits groupes de cellules plasmatiques. La méningite est plus accusée au niveau de certains endroits et c'est là, précisément, qu'on voit des capillaires infiltrés qui se détachent et pénètrent dans l'intérieur. La méningite s'accuse au niveau des sillons, où l'on voit des mononucléaires et quelques cellules plasmatiques. En outre, dans la substance blanche, au-dessus des grosses cellules de la corne d'Ammon, il y a des capillaires infiltrés par des mononucléaires et on voit, dans le tissu nerveux, des polynucléaires libres, à noyau en karyolyse. Les cellules névrogliales sont hypertrophiées. Les cellules nerveuses superficielles sont légèrement altérées. A ce niveau il y a quelques petits vaisseaux à manchon cellulaire. Ce n'est que tout à fait exceptionnellement qu'il y a des nodules névrogliaux, mais, parfois, il existe, par places, dans la première couche de l'écorce, une hyperplasie des cellules névrogliales. La méningite est plus intense du côté de l'hémisphère correspondant à l'inoculation et plutôt à la base qu'à la surface du cerveau.

Pédoncule. — Méningite plus accusée au niveau de l'émergence du moteur oculaire commun. Infiltration périvasculaire, quelques rares nodules névrogliaux lâches, disséminés, siégeant soit à la périphérie, soit dans les tubercules quadrijumeaux. Ces nodules se trouvent d'habitude en relation avec les vaisseaux.

Protubérance. — La substance périépendymaire offre une hyperplasie considérable des cellules névrogliales. Les vaisseaux sont fortement infiltrés par des cellules plasmatiques. Les cellules de la substance ferrugineuse sont en partie disparues et le reste atrophié. Au niveau de l'olive supérieure il y a une infiltration considérable. Le tissu pie-mérien, qui siège dans les sillons, est également infiltré de la même manière.

Cervelet. — Méningite discrète au niveau des sillons, parfois il y a de fortes hémorragies; au niveau des hémisphères la lésion méningée est moins accusée. L'infiltration des vaisseaux

consiste en mononucléaires, lymphocytes et cellules plasmatiques. Au-dessous de la couche granulaire, il y a quelquefois des nodules constitués par des cellules en bâtonnet et des cellules névrogliques.

Dans le *bulbe* il y a une forte méningite à mononucléaires et des petites hémorragies où il se trouve, parfois, des pseudo-éosinophiles libres. L'infiltration prédomine à droite et gagne

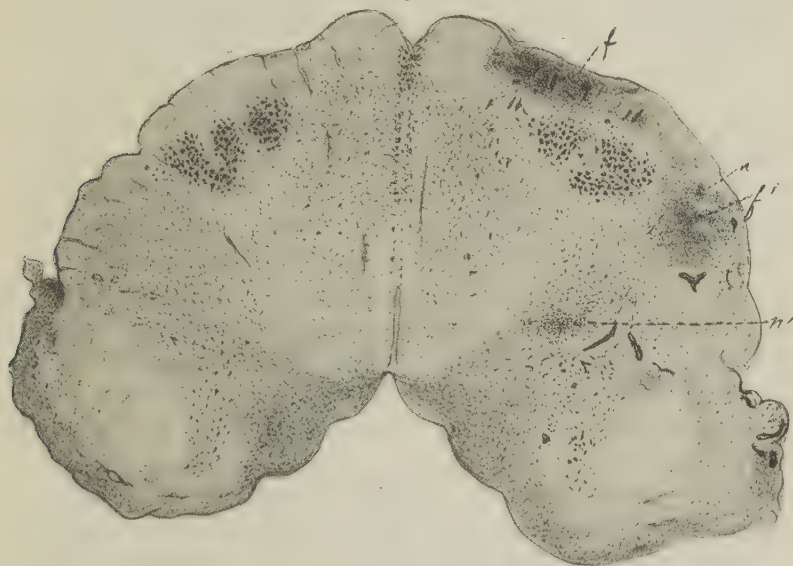


FIG. 1. — Coupe transversale du bulbe de lapin au niveau du tiers supérieur. Inoculation dans la cornée droite. Mort le quinzième jour : *f*, foyer inflammatoire situé au voisinage des pyramides, au niveau des noyaux du facial; *f'*, foyer de dégénérescence intéressant la région antérieure du faisceau de fibres réticulo-spinales et la région antérieure de la racine descendante du trijumeau; *n*, *n'*, nodules névrogliques.

presque toute la moitié droite du bulbe où on trouve une infiltration périvasculaire formant des manchons et quelques nodules inflammatoires, au voisinage des vaisseaux, qui sont constitués par des lymphocytes et des cellules plasmatiques. Il y a aussi des nodules interstitiels, plus lâches, formés plus ou moins exclusivement par des cellules névrogliques.

Il existe, en outre, un foyer de ramollissement dans la partie latérale droite du bulbe (fig. 1). Ce foyer atteint le maximum

d'intensité dans le tiers moyen du bulbe où il occupe le tiers antérieur de la racine descendante du trijumeau droit, les fibres réticulo-spinales droites et une partie du faisceau cérébelleux direct qui, à ce niveau, se dirige vers le corps restiforme. En dedans, la zone de nécrose s'arrête à la formation réticulaire grise et à la substance gélatineuse de Rolando; en avant, elle s'étend jusqu'au voisinage de l'olive inférieure. Le reste de la racine du trijumeau et les régions avoisinantes du foyer nécrotique sont le siège d'une réaction périvasculaire et interstitielle intenses. On peut suivre le foyer de nécrose sur toute l'étendue de la racine descendante du 5^e nerf droit. En bas, on le trouve encore sous le commencement de l'olive bulbaire, extrêmement réduit; en haut, on le voit au niveau du noyau du facial, occupant toujours la racine descendante du trijumeau et la partie antéro-latérale voisine jusqu'au noyau du 7^e nerf crânien. Dans la protubérance, au niveau du noyau masticateur, le foyer a disparu.

Ce foyer est formé par des macrophages et quelques cellules névrogliques hypertrophiées, entre lesquelles on voit des vaisseaux infiltrés par des mononucléaires. La substance grise périépendymaire participe aussi à l'inflammation, qui est plus accusée du côté droit.

Dans la *moelle épinière*, la lésion décroît progressivement, néanmoins nous constatons dans la région cervicale une méningite. Mais, dans les sillons antérieur et postérieur, l'infiltration fait presque défaut. Il y a une légère méningite au niveau de l'émergence de la 1^{re} racine postérieure droite. Dans la substance blanche il y a par-ci, par-là des cylindraxes tuméfiés. Dans la région dorsale la lésion est plus accusée d'un côté, surtout dans la corne postérieure. Dans les vaisseaux de la substance blanche, la lésion paraît moins intense. Il y a une hyperplasie de la névroglie constituant des nodules lâches, d'habitude là où apparaît un vaisseau infiltré. L'infiltration est plus forte dans la région dorsale inférieure, du côté de la corne postérieure, que dans les cornes antérieures.

Dans la moelle lombaire, il y a quelques nodules névrogliques dans la substance blanche et un foyer inflammatoire qui occupe le groupe antéro-externe des cellules, dont la plupart sont disparues. On y voit des petits nodules névrogliques,

dont la plupart siègent autour des vaisseaux. Réaction névroglique autour du canal épendymaire.

LAPIN C, INOCULÉ DANS LA CORNÉE DROITE.

Cerveau (hippocampe). — Lésions légères des méninges; à la surface de la pie-mère, on voit des fibroblastes. Au niveau de la corne d'Ammon, lésion minime; par-ci, par-là des vaisseaux hyperémiés contenant quelques pseudo-éosinophiles. Dans d'autres préparations de la même région, la lésion est également minime.

Dans le *pédoncule*, au niveau des tubercules quadrijumeaux et au niveau de l'oculo-moteur commun, les lésions vasculaires et méningées sont insignifiantes, mais à l'intérieur des vaisseaux de la pie-mère, du côté inoculé et même dans les tubercules quadrijumeaux, des cellules éosinophiles en grand nombre. Les cellules de l'oculo-moteur commun ne sont pas altérées. Légère infiltration des racines de l'oculo-moteur commun du côté de la cornée inoculée. Les vaisseaux du même côté contiennent à l'intérieur des éosinophiles, moins nombreuses du côté opposé.

Dans la *protubérance* et le *cervelet* les lésions méningées sont un peu plus accusées que dans le pédoncule et le cerveau.

Bulbe. — Dans le tiers moyen on trouve un foyer de nécrose, dans lequel il y a des vaisseaux qui se dirigent de la périphérie du bulbe vers la profondeur, dont la paroi est envahie par des cellules plasmatiques qui prédominent et quelques mononucléaires. On retrouve rarement des nodules lâches névrogliques. Au niveau du foyer, lésion méningée. Dans le tiers inférieur le foyer est plus étendu, affectant la forme d'un triangle. Dans le reste du bulbe, il y a une réaction vasculaire minime et méningite réduite. Le foyer, au niveau des pyramides, occupe non seulement la région latérale, mais aussi une partie de la corne postérieure. Les vaisseaux, au niveau du foyer, sont infiltrés par des mononucléaires, des cellules plasmatiques. Entre les cellules granuleuses on rencontre des cellules névrogliques hypertrophiées et proliférées. Nodule dense constitué par des cellules névrogliques, des cellules plasmatiques et quelques polynucléaires dans le noyau du cordon de Burdach,

du même côté que le foyer. Dans la moitié opposée hyperémie des capillaires et présence d'un grand nombre de mononucléaires et lymphocytes à l'intérieur des vaisseaux.

Dans la *moelle épinière* on constate une légère méningite.

Dans les *ganglions spinaux cervicaux* on voit la multiplication des cellules capsulaires et légère infiltration intercellulaire. Quelques cellules offrent un état fenestré.

Lésions insignifiantes dans les *ganglions lombaires*.

LAPIN E, INOCULÉ DANS LA CORNÉE DROITE.

A la base du *cerveau* droit il y a une infiltration des méninges par des mononucléaires et des cellules plasmatiques. Dans le *pédoncule*, on constate un foyer d'hémorragie, au niveau du noyau rouge, qui s'étend jusqu'au voisinage du moteur oculaire commun du côté droit. Il n'y a pas d'infiltration des racines au niveau de l'émergence de ce nerf. Hyperémie des vaisseaux méningés, qui contiennent par-ci, par-là une grande quantité de pseudo-éosinophiles. Dans la *protubérance*, au niveau de l'olive supérieure et du côté droit, on voit un nodule lâche, névroglique, contenant quelques mononucléaires. Hémorragie dans les méninges. Au niveau de l'olive supérieure, il y a une méningite assez intense avec des mononucléaires et fibroblastes, qui se propage sur les septa voisins de la branche descendante du trijumeau où l'on voit quelques petits nodules inflammatoires. La lésion méningée n'est pas exclusivement localisée au côté droit, elle existe aussi du côté opposé.

Dans le *cervelet*, on note des hémorragies méningées et une légère infiltration de la pie-mère et au niveau des sillons, toujours du côté droit; au niveau du tiers moyen du *bulbe* droit on voit un foyer nécrotique hémorragique, occupant les deux tiers antérieurs de la branche descendante du trijumeau et les faisceaux cérébelleux et de Gowers. Les foyers de ramollissement ont le même caractère que chez les deux animaux précédents. Mais on remarque en outre des hémorragies disséminées, à mesure qu'on descend dans le tiers antérieur de la racine descendante du trijumeau. Dans la *moelle*, lésions insignifiantes.

LAPIN F. — SCARIFICATION DE LA CORNÉE DROITE.

Les lésions de l'écorce et à la base du cerveau, au niveau de l'hippocampe, sont insignifiantes.

Pédoncule. — Hémorragie au niveau du moteur oculaire commun et du noyau rouge. Les foyers sont plus grands et plus nombreux à droite. Pas d'inflammation des méninges ni des vaisseaux de la substance grise et de la substance blanche.

Les méninges du *cervelet* sont infiltrées par des mononucléaires. Les veinules de la pie-mère sont bourrées de mononucléaires et de lymphocytes.

Au niveau du noyau masticateur, la *protubérance* n'offre que des lésions minimales des méninges et une légère infiltration périvasculaire.

Dans le *bulbe* il y a un foyer de nécrose qui atteint son maximum au niveau du tiers moyen et qui occupe les deux tiers antérieurs de la racine descendante du trijumeau, détruisant aussi la région des faisceaux cérébelleux et de Gowers jusqu'au voisinage du noyau latéral interne. Il va jusqu'à la périphérie du bulbe où l'on constate une méningite assez intense. Le foyer a la forme d'un triangle dont la base est périphérique et dont le sommet n'arrive pas jusqu'à la substance réticulée grise. Sur les préparations colorées au Sudan, le foyer est constitué par un tissu trabéculaire dans les mailles duquel il y a de nombreux corps granuleux et des lymphocytes; à la périphérie du foyer, les septa et les vaisseaux, de même que les vaisseaux de la substance gélatineuse et du cordon latéral, sont infiltrés. Les fibres radiculaires du glosso-pharyngé et du pneumogastrique, du côté droit, sont lésées et offrent une infiltration au moment où elles quittent le bulbe.

Dans le foyer de ramollissement, il y a aussi des hémorragies. Dans le tiers inférieur du bulbe, au-dessous de l'olive bulbaire, le foyer a diminué d'étendue, il n'occupe plus que la partie antérieure de la branche descendante du trijumeau, une partie de la substance gélatineuse de Rolando et la partie postérieure du cordon latéral. Dans ce foyer, les corps granuleux sont plus rares, il y a une hyperplasie de la névroglie. Les

méninges, les septa et les vaisseaux situés dans le foyer et à sa périphérie sont le siège d'une infiltration intense par des mononucléaires et des cellules plasmatiques. La méningite existe également sur toute la moitié du bulbe droit.

Au niveau de l'origine du noyau du facial la lésion a diminué beaucoup également. Le foyer de nécrose toujours triangulaire occupe le tiers antérieur de la racine descendante

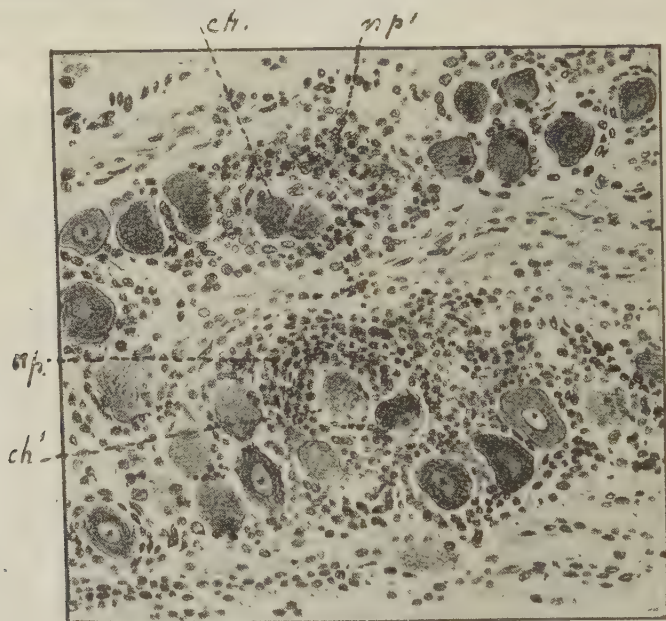


FIG. 2. — Coupe du ganglion de Gasser droit, au niveau de l'origine du nerf ophtalmique. On y voit des lésions pérircellulaires sous forme d'infiltration due en grande partie à l'hyperplasie des cellules capsulaires et glomérulaires (*np*, *np'*). Les cellules nerveuses sont atrophiées et présentent une chromatolyse diffuse (*ch*, *ch'*).

du trijumeau et les fibres réticulo- et rubro-spinales latérales. La méningite de la moitié droite du bulbe se propage aussi le long des septa et des vaisseaux et, en outre, il y a des petits nodules dans le pédoncule cérébelleux inférieur. La lumière des petits vaisseaux contient beaucoup de pseudo-éosinophiles.

Dans le ganglion de Gasser droit (fig. 2) il y a une infiltration lymphocytaire autour et entre certaines cellules qui siègent dans la partie externe du ganglion. Cette infiltration pérircellu-

laire constitue parfois des nodules semblables à ceux qu'on rencontre dans la rage, dans le typhus exanthématique. On voit encore quelques cellules plasmatiques, mais les polynucléaires font complètement défaut.

Dans la *moelle épinière* cervicale supérieure il y a une légère infiltration des petits vaisseaux de la substance grise postérieure, surtout du côté droit. Dans la lumière des vaisseaux on remarque des leucocytes et surtout des pseudo-éosinophiles. Infiltration de la pie-mère, également du côté droit.

Les lésions de la cornée dans la kératite herpétique expéri-



FIG. 3. — Coupe longitudinale de la choroïde (*h*) montrant l'infiltration considérable d'un filet ciliaire (*c*) dans lequel on n'observe que quelques rares fibres nerveuses. A remarquer que la rétine (*r*) de même que la sclérotique n'offrent pas de trace de lésions. L'infiltration du nerf montre la voie suivie par le virus.

mentale ont été décrites par de nombreux auteurs, ainsi nous n'insisterons pas. Mais ces auteurs n'ont pas examiné les nerfs ciliaires, les plexus ciliaires et la choroïde, qui offrent des lésions inflammatoires très marquées et qui nous indiquent la voie suivie par le virus dans sa marche envahissante. En effet, les nerfs ciliaires, sur tout leur parcours, montrent une infiltration lymphocytaire des plus accusées (fig. 3), de sorte que, parfois, les fibres nerveuses sont difficilement visibles à cause de cela. Phénomène important était que les nerfs des muscles des globes oculaires n'offrent que des lésions insignifiantes

qui contrastent avec celles accusées des nerfs ciliaires.

Le nerf optique reste à peu près intact. Par contre, le ganglion ciliaire (fig. 4) présente des lésions inflammatoires aussi considérables sinon plus accusées encore que le nerf



FIG. 4. — Coupe du ganglion ciliaire droit correspondant à la cornée inoculée avec du virus herpétique. Les cellules nerveuses *cn*, *cn'*, *cn''* sont réduites de volume et en chromatolyse. On voit ensuite une infiltration interstitielle par des cellules plasmatiques qui se réunissent parfois en nodule.

ciliaire. Il s'agit d'une infiltration inter et péricellulaire, par des lymphocytes et des cellules plasmatiques, de différentes formes et dimensions. Les cellules nerveuses, à leur tour, sont touchées à différents degrés, lésion consistant surtout en chromatolyse et même plus rarement en achromatose.

LAPIN G, INJECTÉ DANS LE PLEXIFORME GAUCHE
AVEC DE L'ÉMULSION DE LAPIN B².

L'ANIMAL SACRIFIÉ DOUZE JOURS APRÈS L'OPÉRATION.

Le ganglion *plexiforme* et surtout le ganglion cervical supérieur, du côté inoculé, offrent une infiltration périvasculaire et interstitielle, atteignant des proportions extraordinaires. L'infiltration est constituée, en grande partie, par des lymphocytes, auxquels s'ajoutent des gros mononucléaires en quantité variable. L'infiltration existe aussi au niveau de la capsule et on a l'impression qu'elle se propage de la capsule à l'intérieur du ganglion. Les cellules nerveuses sont altérées, étant en chromatolyse diffuse. Dans le tissu cellulaire, au voisinage du ganglion, il y a une infiltration qui se propage même au tissu musculaire voisin.

Bulbe. — Du côté inoculé il y a une réaction périvasculaire moins intense que celle du ganglion plexiforme. La plupart des vaisseaux de la périphérie de l'hémibulbe gauche et leurs ramifications présentent une infiltration par des cellules plasmatiques, quelques pseudo-éosinophiles et lymphocytes. Les pseudo-éosinophiles siègent à l'intérieur et dans la paroi des vaisseaux. L'infiltration se propage à la substance réticulée grise, la substance réticulée blanche restant à peu près intacte. Dans la substance réticulée grise la prolifération névroglique est très intense et englobe des groupes de cellules nerveuses. Le noyau dorsal du pneumogastrique présente une infiltration intense par des lymphocytes et cellules névrogliques. On constate, en outre, une périvascularite marquée au niveau du noyau ambigu. Sur toute la hauteur du bulbe le processus inflammatoire est localisé presque exclusivement du côté de l'hémibulbe gauche; néanmoins il y a une réaction vasculaire inflammatoire également au niveau de la substance périépendymaire du côté opposé. En dehors de ces lésions inflammatoires il y a dans les tiers moyen et supérieur du bulbe un foyer de nécrose qui détruit la région des fibres spino-cérébelleuses et la partie externe de la racine descendante du trijumeau et dans lequel on voit de nombreux macrophages, quelques rares fibres nerveuses, une hyperplasie des

cellules névrogliques et des vaisseaux très infiltrés. Le foyer de nécrose descend aussi dans la moitié inférieure du bulbe, au niveau de l'entre-croisement des pyramides, et même on le retrouve dans la *moelle cervicale supérieure* très réduit et occupant la racine descendante du trijumeau gauche. Les méninges sont très infiltrées à ce niveau, de même que les vaisseaux et les septa qui pénètrent dans la substance gélatineuse de Rolando où l'on rencontre des foyers d'inflammation. Dans la corne postérieure, du même côté, il y a des manchons périvasculaires et des nodules constitués par des lymphocytes et des cellules névrogliques; les vaisseaux du septum postérieur offrent une infiltration modérée.

Dans la *protubérance*, la zone de nécrose disparaît, mais on aperçoit une petite zone hémorragique, située immédiatement en avant du corps restiforme.

Le *cerveau* offre des lésions minuscules consistant dans une légère inflammation, par des mononucléaires, des méninges et des parois des vaisseaux. La région de l'hippocampe n'offre des lésions plus accusées que dans le reste du cerveau.

Dans le *ganglion de Gasser droit* comme dans le ganglion de Gasser gauche il n'y a pas de lésion.

LAPIN B¹. — INOCULATION SOUS LA DURE-MÈRE,
MORT LE SIXIÈME JOUR.

Cerveau. — Méningite au niveau et au voisinage de l'endroit de l'inoculation cérébrale; on voit une méningite hémorragique considérable, dans laquelle on distingue un très grand nombre de cellules pseudo-éosinophiles, des leucocytes à noyau pycnotique et des mononucléaires. On aperçoit, en outre, des débris provenant de la destruction des leucocytes. Le long des septa de la pie-mère se trouvent également des pseudo-éosinophiles situées tantôt à la périphérie, tantôt au point de bifurcation des vaisseaux. Dans le réseau capillaire profond de la substance grise on voit par-ci, par-là des éosinophiles. Les petits vaisseaux présentent une tuméfaction de l'endothélium. La substance grise périépendymaire située en arrière du noyau rouge offre des manchons cellulaires dans la constitution desquels entre, en dehors des mononucléaires, un

assez grand nombre de pseudo-éosinophiles. Nous retrouvons ces dernières dans les capillaires et mêmes libres dans le tissu nerveux, à une certaine distance de l'endroit d'inoculation. Dans l'hippocampe, il y a des lésions méningées et

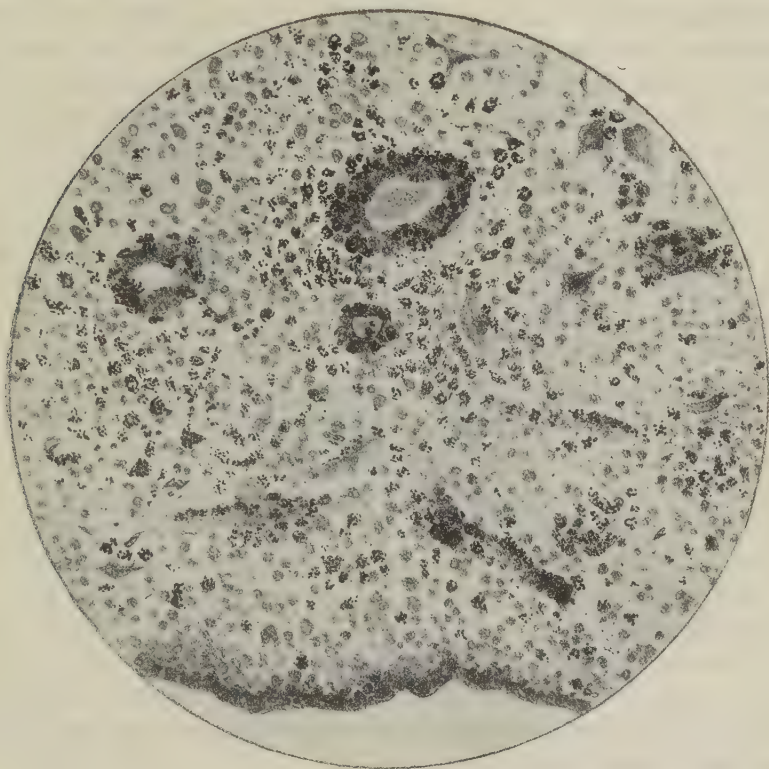


FIG. 5. — Coupe transversale de la protubérance, au niveau de la substance grise périépendymaire. Dans les manchons pérircellulaires et même disséminées dans le tissu nerveux, on voit un grand nombre de cellules pseudo-éosinophiles dont les granulations se teignent en rouge par le Giemsa.

des vaisseaux, mais elles sont beaucoup moins accusées.

Dans le *pédoncule*, au niveau des tubercules quadrijumeaux, du côté droit, il y a des petits foyers de ramollissement et des pseudo-éosinophiles libres dans le parenchyme. De la périphérie du pédoncule se détachent des vaisseaux fortement infiltrés par des polynucléaires et des mononucléaires.

Dans la *protubérance* il y a un foyer de ramollissement hémorragique qui détruit la substance réticulée blanche, allant jusqu'au raphé et détruisant la région rétro-olivaire, mais il n'arrive pas jusqu'au noyau du moteur oculaire externe; latéralement il va jusqu'à la périphérie. La substance grise périépendymaire latérale droite (fig. 5) est infiltrée par des cellules pseudo-éosinophiles soit disséminées dans le parenchyme, soit siégeant dans la paroi des vaisseaux, surtout à la périphérie. Autour des petits vaisseaux il y a des manchons. Les éosinophiles produisent une fonte de la périphérie du protoplasma des cellules nerveuses et se logent dans le neurone.

Dans le *bulbe*, au niveau du facial, le foyer disparaît, mais il y a une méningite et une infiltration vasculaire toujours plus accusées du côté droit. La substance grise périépendymaire présente des vaisseaux avec des manchons constitués par des mononucléaires et des pseudo-éosinophiles. Multiplication des cellules névrogliques soit au niveau de l'épendyme, soit dans la substance blanche où elles forment des nodules (fig. 6), il y a aussi des pseudo-éosinophiles et des polyblastes. Au niveau de l'angle où se trouvent la racine vestibulaire et le noyau latéral à droite, il y a des lésions vasculaires. La méningite diminue à mesure qu'on descend vers la *moelle épinière* dans laquelle l'infiltration est plus discrète; il n'y a pas de manchons péri-vasculaires et parfois il y a des plaques de méningite au niveau de la région latérale de la moelle droite. Les méninges des racines sont également intéressées. L'inflammation se propage le long des racines postérieures, mais elle est très atténuée dans les ganglions.

LAPIN B². — INOCULATION SOUS LA DURE-MÈRE,
MORT LE TREIZIÈME JOUR.

Au niveau de l'inoculation, il y a une méningite hémorragique très intense; au voisinage, infiltration des vaisseaux qui se détachent de la pie-mère. Dans les méninges et les vaisseaux de l'écorce il y a des mononucléaires. On distingue en outre des plaques de méningite. L'inflammation des vaisseaux se propage dans la substance blanche où on retrouve la même infiltration par des mononucléaires et par des cellules plasma-

tiques. Au voisinage du foyer on trouve une quantité considérable de mononucléaires disséminés ou à la périphérie du tissu nécrotique.

Dans le *pédoncule* on constate une lésion considérable à la

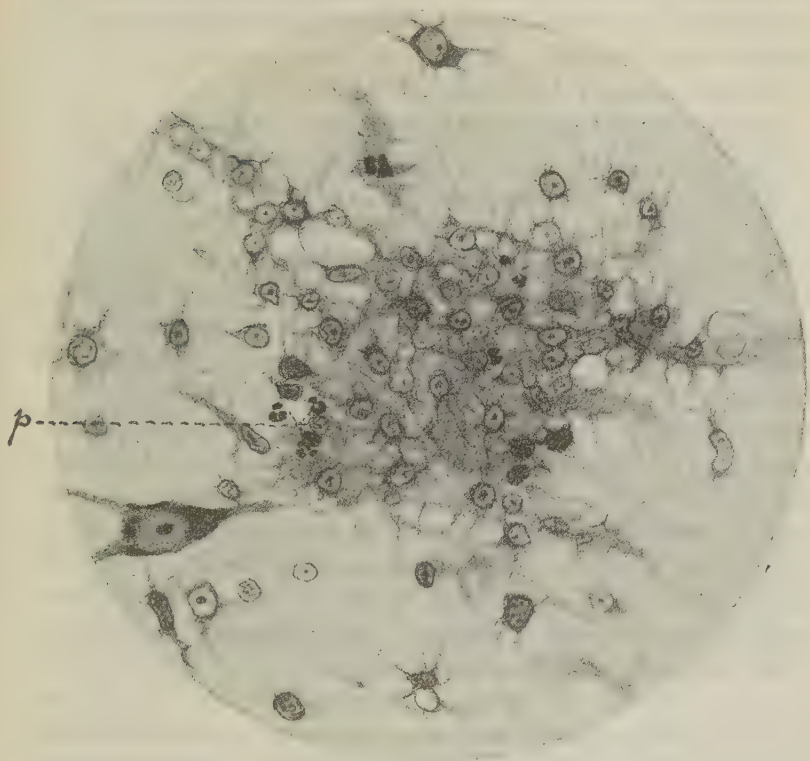


FIG. 6. — Nodule lâche arborescent situé au voisinage de la substance réticulée grise du bulbe et constitué essentiellement par des cellules névrogliques, très rapprochées les uns des autres dans le centre, et plus espacées à la périphérie, avec de nombreuses ramifications. En bas et à gauche on voit trois polynucléaires pseudo-éosinophiles (p).

périphérie, dans les méninges de la face antérieure, affectant même un caractère annulaire. La méningite est plus accusée du côté de l'hémisphère inoculé. Dans le pied du pédoncule on voit un réseau de vaisseaux néoformés. L'infiltration existe également dans l'adventice des artérioles. On voit un certain nombre de polynucléaires à noyau pycnotique et des nodules

soit névrogliques, soit constitués par des cellules plasmatiques des polyblastes et des mononucléaires qui peuvent atteindre une dimension assez considérable.

Dans le *bulbe* légère méningite et présence de nodules névrogliques disséminés. En outre, il y a un foyer de nécrose consécutif à une hémorragie, situé près du noyau ambigu du côté de l'inoculation.

Légère méningite dans la moelle épinière.

LAPINE H, INJECTÉE DANS LE SCIATIQUE AVEC
DE L'ÉMULSION DE LAPIN B^a.

Sciatique injecté. — Infiltration du périnèvre qui se propage le long des capillaires, de sorte que, sur des coupes longitudinales, le nerf est sillonné par des capillaires infiltrés par de grands et moyens mononucléaires et par des lymphocytes. Certaines fibres sont fragmentées et offrent les ovoïdes de la dégénérescence wallérienne. L'infiltration des capillaires est si intense qu'elle forme des manchons autour de ceux-ci. Les fibroblastes de l'endonèvre sont hyperplasiés. En dehors de l'infiltration périvasculaire, on aperçoit des mononucléaires et des lymphocytes libres entre les fibres conjonctives. Par-ci, par-là, les noyaux de Schwann sont multipliés et entourés d'une masse protoplasmique abondante. L'inflammation se propage le long du nerf sciatique jusqu'à la racine.

L'inflammation se propage d'abord jusqu'aux ganglions (fig. 7) où elle atteint le maximum. Les cellules nerveuses sont comme étouffées par les nodules leucocytaires et par la prolifération des éléments satellites de la capsule.

L'inflammation se propage ensuite du ganglion aux racines, par l'intermédiaire des gaines périvasculaires, la racine postérieure étant plus touchée que la racine antérieure.

Au niveau de la *moelle lombo-sacrée* (fig. 8), d'où le sciatique tire son origine, on constate un foyer de nécrose dans la moitié postérieure des cordons de Goll et de Burdach. La zone nécrosée est, en partie, tombée, par les manœuvres histologiques, laissant, à sa place, une cavité. Dans la moitié correspondant au sciatique injecté, on constate une méningo-radiculite, l'infiltration ayant lieu du côté de l'adventice des

veines, tandis que la paroi des artérioles est normale. Les vaisseaux qui se détachent de la périphérie et pénètrent dans la substance blanche antéro-latérale et leurs ramifications sont également infiltrés. L'infiltration diminue à mesure que les vaisseaux se ramifient.

Le maximum de lésion se trouve au niveau de la substance grise antérieure et postérieure. Dans la paroi des vaisseaux il

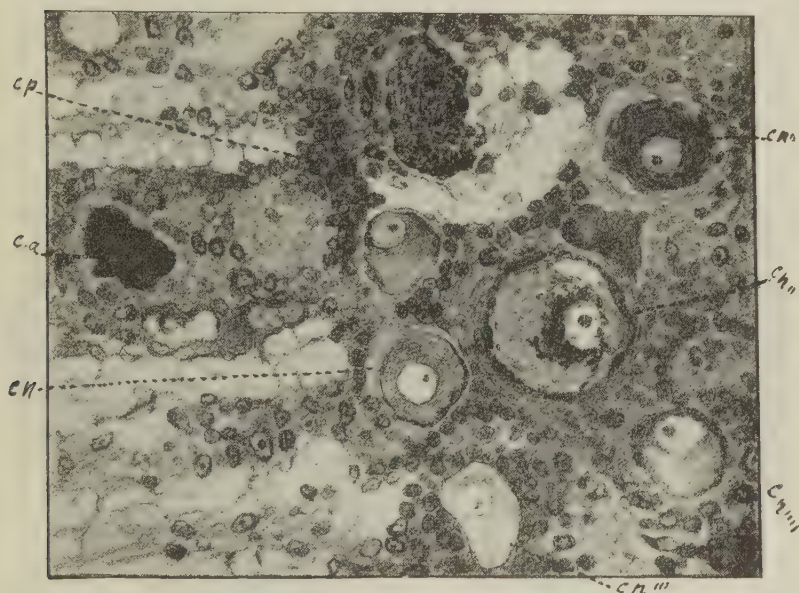


FIG. 7. — Coupe longitudinale du premier ganglion sacré droit d'un lapin inoculé avec du virus herpétique dans le nerf sciatique du même côté. On y voit une altération très accusée des cellules nerveuses qui va de la chromatolyse périphérique (cn'') et de la chromatolyse centrale (cn , cn''') jusqu'à l'achromatose (cn'''). En ca , on voit une cellule rétractée, atrophiquée, et en état de chromophilie. Autour des cellules nerveuses, il y a une infiltration considérable par des cellules plasmatiques (cp) plus accusée autour de la cellule ca .

y a un nombre considérable de mononucléaires et quelques lymphocytes. On y voit également des cellules plasmatiques. La réaction névroglique est fort intense. Les cellules névrogliques sont augmentées de nombre et de volume, formant une espèce d'arborescence élégante, en rapport avec les vaisseaux. On compte jusqu'à 400 de ces nodules arborescents sur une

coupe de la moelle. L'infiltration est apportée à la substance grise par les vaisseaux radiculaires. La paroi des vaisseaux des sillons antérieur et postérieur prend part également au processus inflammatoire, mais les lésions ne sont pas si accusées que celles des veinules radiculaires et de la substance blanche. Il y a, en outre, une infiltration des vaisseaux de la commissure grise postérieure. Les lésions que nous venons de

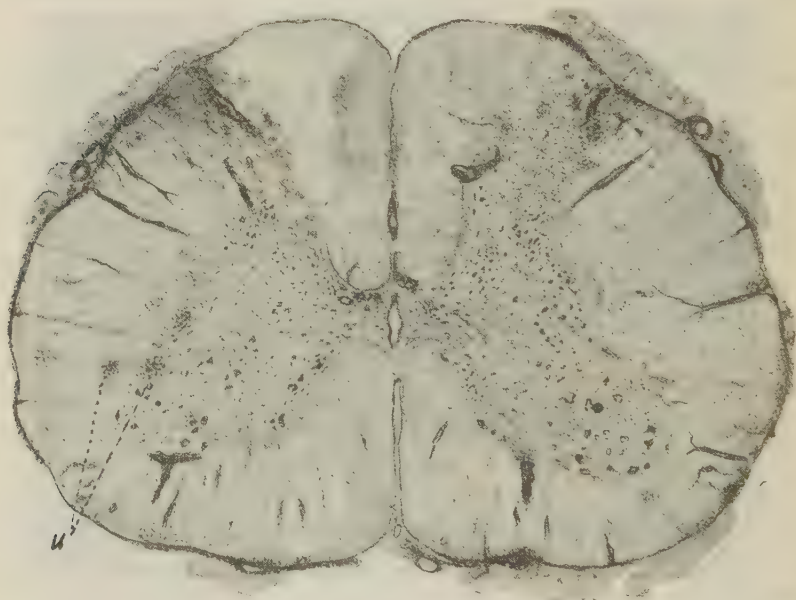


FIG. 8. — Coupe de la moelle sacrée supérieure du lapin injecté avec du virus herpétique dans le nerf sciatique droit. Dans le cordon postérieur du même côté, on voit une région triangulaire dont la base est formée par la périphérie de la moelle; un côté longe la substance grise postérieure qui est en partie détruite et l'autre la substance blanche du cordon postérieur. C'est la place occupée par le foyer de ramollissement où le tissu nécrosé est tombé à la suite des manipulations. Dans la substance grise et blanche antérieure et postérieure on aperçoit des vaisseaux infiltrés par des leucocytes.

décrire concernent la moitié de la moelle du côté de la lésion du sciatique, mais le côté opposé présente aussi une méningo-radiculite accusée et les vaisseaux de la substance grise postérieure sont très infiltrés. On y voit également quelques nodules névrogliques dans lesquels pénètrent aussi des cellules mobiles,

mais, à coup sûr, la méningo-myélite du côté gauche est moins intense que celle du côté droit. Même, dans ce côté gauche, la lésion est plus accusée dans la substance grise postérieure.

La veinule se distribuant au foyer de ramollissement est très comprimée par la masse des cellules d'infiltration.

Dans la *moelle dorsale* les lésions diminuent d'intensité, mais la méningo-radculite et l'infiltration des vaisseaux de la substance blanche persistent encore. La lésion est toujours plus accentuée du côté droit.

Bulbe. — Lésions considérables de méningo-bulbite, localisées surtout dans la substance grise. La méningite est circulaire, mais elle est plus accusée là où les vaisseaux, qui pénètrent dans le bulbe, tirent leur origine. L'infiltration domine dans la paroi des veinules qui pénètrent dans le bulbe; elle est moins intense dans leurs ramifications et fort discrète dans les capillaires.

Dans la substance blanche on voit des nodules névrogliques lâches. Les nodules névrogliques contiennent également des leucocytes.

Dans le *cervelet*, on trouve une méningite plus accusée à certaines régions, d'où il se détache des vaisseaux infiltrés dans la couche moléculaire. Au voisinage de ces vaisseaux il existe une prolifération névroglique.

Enfin, même les méninges du *cortex* sont légèrement prises, mais le processus inflammatoire est très discret et consiste dans la présence de quelques mononucléaires dans l'adventice des petits vaisseaux des méninges et de la substance grise, au voisinage du 3^e ventricule.

Dans le *placenta* il y a des foyers d'hémorragie et d'inflammation périvasculaire.

COBAYE, MORT QUINZE JOURS APRÈS L'INJECTION, DANS LE SCIATIQUE,
D'ÉMULSION DE CENTRES NERVEUX DU LAPIN B¹.

Dans le *sciatique* on voit dans des capillaires situés dans le tissu nerveux une infiltration par des lymphocytes et prolifération des fibroblastes. La lésion est moins intense que chez le lapin injecté dans le sciatique.

Dans le *tiers inférieur* du sciatique, immédiatement au-dessous du point d'injection il y a une infiltration des petits vaisseaux et des espaces intertubulaires par des lymphocytes et des mononucléaires qui, parfois, sont disposés en forme de nodules. Là où l'infiltration est plus accusée, on observe des fibres nerveuses en voie de dégénérescence et la prolifération des noyaux de la gaine de Schwann. On peut suivre le processus inflammatoire sur tout le parcours du nerf jusque dans le ganglion. Il est à noter que l'infiltration périvasculaire et les nodules varient d'intensité comme de volume et dans les faisceaux nerveux et dans les divers points du trajet du sciatique.

C'est ainsi qu'on voit, au niveau de certains points, l'inflammation de tout le réseau vasculaire, tandis que, dans d'autres points, l'inflammation est réduite. Le processus inflammatoire est intense dans le tissu interstitiel et de proche en proche arrive au pôle externe du *ganglion spinal*, d'où il envahit aussi bien le centre du ganglion que la région périphérique. En dehors de la multiplication des fibroblastes, l'infiltration des petits vaisseaux des ganglions, on voit une réaction cellulaire autour des cellules nerveuses et des glomérules, intéressant à la fois les cellules de la capsule, les cellules amiboïdes de Cajal et les satellites, au point que la cellule nerveuse, légèrement comprimée au début, devient, à la fin, le siège d'une cytolypse et de la neuronophagie qui finissent, après la destruction de la cellule, à la formation d'un nodule comparable à celui qu'on observe dans la poliomyélite.

La *moelle sacrée* est le siège d'une légère infiltration des capillaires de la substance grise, surtout au niveau de la région intermédiaire entre la corne antérieure et la postérieure. En outre il y a une prolifération névroglie et un foyer de nécrose correspondant du côté du nerf injecté.

Il occupe la région du cordon postérieur. Le foyer qui intéresse aussi la commissure grise du côté droit est constitué essentiellement par des macrophages, dérivant probablement de la *mésoglie*. A mesure que l'on monte vers la *région lombaire et dorsale inférieure* l'étendue du foyer diminue et se cantonne dans la substance grise voisine de la commissure postérieure et à la substance blanche adjacente. L'infiltration accusée des méninges est localisée presque exclusivement au

niveau de la région moyenne des cordons postérieurs. Les vaisseaux du septum postérieur sont également infiltrés. Dans la substance grise intermédiaire du côté opposé on voit un vaisseau avec infiltration cellulaire et à la périphérie une multiplication des cellules névrogliques. Sur tout le parcours de la *région dorsale* on voit des foyers névrogliques arborescents disséminés soit dans la substance grise soit dans la substance blanche. Dans cette dernière ils sont lâches et arborescents, tandis que ceux de la substance grise sont plus denses.

Dans l'inflammation des méninges il y a un certain nombre d'éosinophiles, mais les mononucléaires y prédominent. Les foyers dont nous venons de parler siègent du côté droit, c'est-à-dire du côté de l'injection; il est à noter qu'en opposition avec la réaction névroglique, l'infiltration des vaisseaux est très réduite.

Dans le *bulbe* il y a quelques vaisseaux infiltrés par des lymphocytes et des pseudo-éosinophiles. On voit aussi quelques nodules névrogliques disséminés dans la substance grise. L'infiltration des vaisseaux est insignifiante.

Dans la *protubérance*, le *pédoncule* et le *cerveau*, en dehors de légères infiltrations, des hyperémies et des hémorragies, nous ne remarquons pas d'autres lésions.

II

Comme on l'a vu dans la description de la symptomatologie et des lésions constatées chez les animaux inoculés avec le matériel d'herpès récidivant d'un sujet atteint de paralysie générale progressive, il s'agit d'une souche ayant un neurotropisme fort accusé. On a injecté le virus tantôt dans la cornée, tantôt dans un nerf périphérique, ou bien encore dans le ganglion plexiforme; on a fait également des passages; toujours on a constaté des désordres nerveux dus à des lésions matérielles très accusées, ce qui prouve que le neurotropisme du virus herpétique peut être, tout au moins dans certains cas, aussi constant que celui de l'encéphalite épidémique. Il est vrai que nous avons fait, au niveau du limbe de la cornée, plusieurs scarifications dans le but d'atteindre un plus grand nombre de filets nerveux, et ainsi nous avons pu voir que le virus intro-

duit de telle façon par voie cornéenne détermine des symptômes parmi lesquels les troubles cérébelleux et vestibulaires jouent un rôle important. Ce serait là une méthode expérimentale produisant, d'une manière à peu près constante, le manège. Davantage, nous avons constaté, dans ce cas, un foyer de nécrose, dont la topographie explique ces symptômes, car il intéresse le pédoncule cérébelleux inférieur, le noyau de Deiters qui est moins touché et la racine descendante du trijumeau.

En dehors de ce foyer de ramollissement nous avons trouvé, que, dans la plupart des cas, la réaction névroglique est beaucoup plus considérable que celle constatée par nos prédécesseurs et qu'elle se présente sous forme de nodules lâches arborescents, constitués par des cellules névrogliques, siégeant de préférence dans la substance blanche, soit qu'ils aient une composition plus complexe, et alors ils revêtent l'aspect des formations que nous avons décrites dans le typhus exanthématique et dans un cas de malaria du système nerveux.

La notion du neurotropisme affecte des relations avec le problème du virus nerveux, aussi il est utile de préciser la signification de ce terme. On connaît qu'il y a diverses formes de tropisme : héliotropisme, géotropisme, phototropisme et haptotropisme.

Nous allons insister davantage sur le chimiotaxisme, c'est-à-dire la sensibilité à diverses substances chimiques diffusant dans le milieu.

Depuis les recherches de Pfeffer et les expériences de Massart et Bordet, les exemples de chimiotaxisme se sont multipliés. Mais c'est surtout en matière de régénérescence nerveuse que Forssmann édifia sa théorie de l'attraction chimique dans le système nerveux et ainsi la notion de neurotropisme a été admise par la science. Cajal le premier émit l'hypothèse que l'orientation du cylindraxe et des prolongements nerveux en général pourrait être dirigée par l'existence des courants de substances positivement chimiotaxiques élaborées par les cellules vers lesquelles doivent se diriger les axones. Grâce aux recherches de Dustin, Nageotte, les nôtres et celles d'Ariens Kappers, la notion de neurotropisme est entrée dans une voie nouvelle. On ne doit pas les ignorer quand il s'agit de virus ayant une affinité pour le système nerveux.

En effet, l'émigration des ultra-virus, tout en se faisant au hasard de la moindre résistance, chemine le long des voies préformées des filets nerveux, de sorte qu'on peut déterminer, comme c'est le cas pour le virus inoculé dans la cornée, la trajectoire du virus herpétique. L'idée de virus nerveux, infiniment séduisante, a détourné l'attention des chercheurs d'autres facteurs, parmi lesquels l'existence des voies préformées dans lesquelles chemine le virus joue un rôle important.

Il serait hasardeux d'admettre que les différents centres nerveux envoient des substances chimiotaxiques pour attirer le virus neurotrope dans certaines régions du névraxe. Ainsi, par exemple, on ne saurait admettre que le virus de la poliomyélite, injecté sous la dure-mère cérébrale, soit attiré par les cellules de la substance grise lombaire où il se localise. Le facteur mécanique, c'est-à-dire l'odogenèse, et la loi de la moindre résistance guident l'émigration du virus pour atteindre cette région lombaire. Les expériences que l'un de nous a entreprises autrefois sur l'inoculation du virus poliomyélitique, envoyé obligeamment par Flexner, nous ont montré que l'odogenèse existe non seulement pour le virus de l'herpès, mais aussi pour celui de la poliomyélite ¹⁾.

C'est ainsi qu'en injectant quelques gouttes de ce dernier virus dans le ganglion plexiforme ou cervical supérieur, nous allons voir que le virus chemine le long des voies nerveuses jusqu'au bulbe où il se loge dans les espaces lymphatiques qui existent dans le tissu névroglie et dans la gaine externe des vaisseaux de la substance grise du plancher du 4^e ventricule. Ici, il attaque de préférence les cellules de l'hypoglosse du même côté que l'injection, parce que la vascularisation de ce noyau est plus riche et ensuite parce que, probablement, la viscosité du gel de ces cellules est moindre que celle des cellules du noyau dorsal qui effectivement est moins altéré. En tout cas, c'est la substance grise postérieure du bulbe qui est touchée et précisément en vertu du principe d'odogenèse et du chemin le plus court qui sépare le point d'introduction du virus des centres nerveux les plus rapprochés qui est le bulbe. C'est là

(1) G. MARINESCO, Sur l'histologie fine de la poliomyélite expérimentale. *C. R. de la Soc. de Biol. de Paris*, 1914, 70, p. 80-82.

la raison pour laquelle l'un de nous a soutenu, pour la première fois (1), que le virus encéphalitique se propage du rhino-pharynx au mésocéphale le long des lymphatiques et des filets nerveux et notre hypothèse a été confirmée par les recherches ultérieures des différents auteurs.

Enfin, lorsque l'introduction du virus herpétique a lieu dans les nerfs périphériques, tels que le sciatique, le médian, etc., on peut suivre sa propagation le long de ces nerfs jusqu'aux ganglions spinaux qui donnent naissance aux fibres sensitives. C'est là la phase ganglionnaire de la névrite ascendante, puis on suit l'inflammation le long des vaisseaux lymphatiques des racines postérieures et l'arrivée du virus à la périphérie de la moelle (phase médullaire de la névrite ascendante). Comme on l'a vu, la lésion intéresse également le système centripète, cordons postérieurs et corne postérieure du même côté que l'injection, plus que les cornes et les racines antérieures. Même de plus, ici, il se produit un phénomène semblable à celui constaté après l'inoculation du virus dans la cornée. Il y a, en effet, un foyer de nécrose dans le système sensitif de la moelle, c'est-à-dire dans le cordon postérieur, comme il se produit au niveau de la branche descendante du trijumeau dans le bulbe, après l'introduction du virus dans le ganglion plexiforme ou dans la cornée.

Nos recherches démontrent, avec la dernière évidence, que la porte d'entrée du virus herpétique gouverne sa marche et sa localisation dans le système nerveux central, de sorte que « la zone élective » est sous la dépendance immédiate de l'endroit de la pénétration du virus. C'est ainsi que l'infection de la cornée se propage en ligne droite à partir du point d'inoculation, par l'intermédiaire des nerfs ciliaires, la choroïde et les processus ciliaires qui, étant touchés également, produisent une réaction inflammatoire intense des ganglions ciliaires; puis le virus suit le nerf ophtalmique pour arriver au ganglion de Gasser où l'inflammation siège dans le segment externe de ce ganglion; ensuite l'inflammation arrive au bulbe, où la lésion atteint d'habitude son maximum, détermi-

(1) G. MARINESCO, Report of an inquiry into an obscure disease, *Encephalitis lethargica*. Reports to the local Government Board. *New Series*, n° 121 London, 1918.

nant là un foyer de ramollissement intéressant de préférence la branche descendante du trijumeau (fig. 9).

Il est même curieux de constater que la racine motrice du ganglion ciliaire et le nerf moteur oculaire commun restent à peu près intacts. Le virus gagne la moelle cervicale et même il peut se propager jusqu'à la moelle lombaire, mais il s'agit plutôt d'une lésion discontinue. La méningite est localisée au septum antérieur et les foyers d'inflammation, dans la moelle épinière, sont disséminés. Si l'inoculation du virus a lieu sous

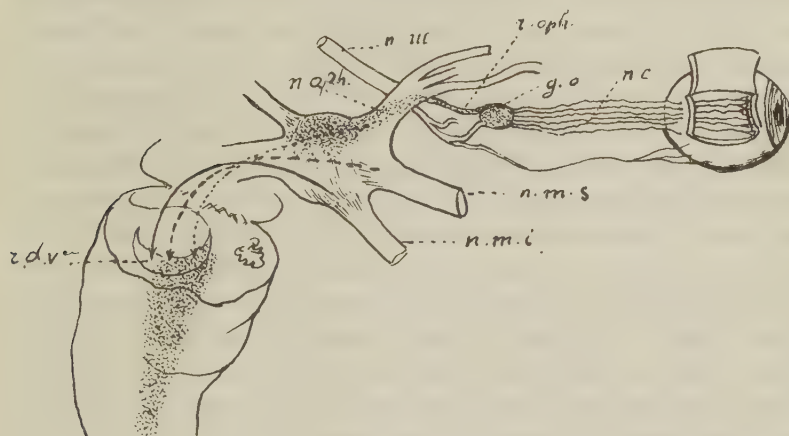


FIG. 9. — Schéma destiné à montrer les voies de transmission du virus herpétique à partir de la cornée sur le parcours des nerfs ciliaires (nc), du ganglion ciliaire (go) et de sa racine sensitive (r. oph), du nerf ophtalmique (n. oph) jusqu'à la région externe du ganglion de Gasser. Ensuite dans le bulbe on voit un foyer de dégénérescence intéressant la branche descendante du trijumeau.

la dure-mère du cerveau, nous constatons toujours que le maximum d'inflammation est dans la région où on a pratiqué l'injection. C'est pour cette raison que nous avons toujours trouvé les lésions les plus intenses au niveau du tiers antérieur du cerveau et du côté de l'hémisphère inoculé.

Suivant Kling, Davide et Liljenquist (1) on trouve dans

(1) KLING, DAVIDE et LILJENQUIST, Considérations générales sur l'encéphalite épidémique expérimentale chez le lapin. L'encéphalite épidémique expérimentale chez le lapin et virus herpétique et virus encéphalitique. *C. R. Soc. de Biol.*, séance du 10 Juin 1922.

l'encéphalite herpétique expérimentale, lorsque les animaux succombent après quatre à cinq jours, une infiltration des méninges par des mononucléaires, soit des lymphocytes ordinaires, soit des éléments volumineux et on rencontre aussi un certain nombre de polynucléaires. En outre, dans l'écorce cérébrale, on voit une infiltration diffuse, où il y a des polynucléaires, dispersés ou constituant des amas avec l'aspect de petits abcès. L'altération se localise le plus constamment à la partie inférieure et postérieure de l'écorce. Quand l'infection des animaux a une marche très rapide, la maladie prend un caractère de méningite aiguë, les polynucléaires étant nombreux. Le mésocéphale est peu atteint. Dans l'encéphalite épidémique expérimentale, les auteurs suédois trouvent des lésions d'un aspect tout différent. Il y a ici une méningite, mais, en général, plus discrète. Les cellules qui forment l'infiltration vasculaire sont la plupart des lymphocytes ; les autres, de grands mononucléaires ; il n'y a pas de polynucléaires. L'écorce cérébrale paraît, en général, indemne. On y cherche en vain l'infiltration par des polynucléaires qui caractérise l'encéphalite herpétique. Le mésocéphale, par contre, est le siège principal de l'inflammation. La méningite est ici plus accusée, mais ce sont surtout les altérations des vaisseaux du parenchyme qui offrent une infiltration accusée se composant de lymphocytes, de polyblastes et de quelques cellules plasmiques. Les manchons périvasculaires sont, assez souvent, très épais et ressemblent à ceux observés chez l'homme. C'est pour cette raison, que Kling, Davide et Liljenquist concluent que les lésions engendrées par le virus de l'encéphalite sont de tout autre nature que celles produites par le virus herpétique et que les faits avancés ne sont pas en faveur de l'identité des deux virus.

C'est à juste raison que Levaditi et Nicolau combattent les conclusions de Kling et de ses collaborateurs, opinions que partage également Arric. En effet, l'aspect des lésions ne dépend pas du tout de la nature différente du virus herpétique ou d'encéphalite mais, en première ligne de la virulence de l'agent pathogène. On peut, en employant seulement le virus herpétique constater toute la gamme des lésions, suivant la durée de la maladie. Lorsque celle-ci affecte une marche

aiguë, ce sont les polynucléaires pseudo-éosinophiles qui prédominent et les lymphocytes, tandis que lorsque la maladie dure plus longtemps, les polynucléaires finissent par disparaître et il y a des manchons périvasculaires à lymphocytes et à cellules plasmatiques.

Nicolau et Poincloux, Schnabel et plus tard Zdansky ont montré également que la constitution des infiltrations vasculaires et leur distribution dans l'encéphalite herpétique dépendent de la durée de la maladie et de la virulence du virus de passage.

Nos expériences concordent avec celles des auteurs cités. En effet, nous avons constaté combien le tableau histologique de l'encéphalite herpétique varie suivant la durée de la maladie. Lorsque la maladie évolue rapidement, quelle que soit la voie d'entrée du virus, l'inflammation est représentée surtout par des polynucléaires. Si, au contraire, l'affection prend une marche plus lente, le tableau change, car ce sont les mononucléaires qui prédominent.

Plusieurs auteurs ont agité dernièrement la question de la relation entre le virus herpétique et celui de l'encéphalite épidémique. Doerr et Voegtung (1) ont été frappés par la ressemblance des phénomènes constatés chez les lapins inoculés à l'aide du virus d'encéphalite et ceux des lapins inoculés avec du virus herpétique. Puis la kératite et la conjonctivite que Levaditi et Harvier ont observées chez le lapin inoculé avec le virus de l'encéphalite et surtout les essais d'immunité croisée apportent, suivant Doerr et Schnabel (2), Levaditi, Harvier et Nicolau (3), une preuve démonstrative en faveur de l'identité des virus herpétique et d'encéphalite. Levaditi, Harvier et Nicolau (4), à la suite de leurs expériences entreprises avec le virus Blanc (B), ont montré que ce virus ne saurait être distinct de celui de l'encéphalite, qu'il n'y aurait, entre les deux, qu'une différence de virulence, celui de l'herpès étant, en général, d'une activité moins marquée que celui de l'encé-

(1) DOERR et VOEGTUNG. *Revue générale d'ophtalmologie*, 34, p. 409.

(2) DOERR et SCHNABEL. *Schweizerische med. Wochenschr.*, p. 469, 1921.

(3) LEVADITI et NICOLAU. *C. R. Soc. de Biol.*, séances des 15 juillet et 25 novembre 1922.

(4) LEVADITI, HARVIER et NICOLAU. *C. R. Soc. de Biol.*, p. 213, 1921

phalite. Même filtrabilité, même conservation dans la glycérine et à l'état sec, même symptomatologie chez les animaux par voie oculaire ou cérébrale. De plus, identité absolue en ce qui concerne les lésions histo-pathologiques. En effet, on constate, chez les lapins injectés, la méningite à mononucléaires, les manchons périvasculaires et aussi les lésions inflammatoires et la neuronophagie au niveau de la zone élective. Sans doute, les expériences précises de Doerr et Schnabel (1) démontrent qu'il y a un rapport étroit entre le virus herpétique et celui de l'encéphalite épidémique, mais peut-on conclure de là que les deux virus sont identiques? Nous pensons qu'à ce point de vue on peut faire certaines réserves. Le caractère récidivant et bénin de l'herpès chez l'homme, l'absence de phénomènes d'encéphalite surtout si l'on admet la présence de ce virus dans la salive, la coïncidence qui n'est pas exceptionnelle de l'herpès et de l'encéphalite épidémique comme cela résulte des recherches de Poisot, et puis le fait que la peau est réceptive au virus herpétique, chez des malades atteints d'encéphalite épidémique; enfin, la présence d'épidémies d'herpès chez les personnes qui viennent en contact, alors que cette contagiosité est rare pour l'encéphalite épidémique, constituent autant d'arguments qui contredisent l'identité du virus herpétique et celui de l'encéphalite épidémique. Aussi, en l'état actuel de nos connaissances, on ne saurait accepter que sous la réserve des expériences ultérieures l'opinion de Doerr et Schnabel.

Nous pouvons confirmer les constatations faites par Gastinel, Reilly, etc., en ce qui concerne la réceptivité au virus herpétique de la peau des malades atteints d'encéphalite épidémique. En effet, nous avons obtenu, par inoculation, au moins dans un cas d'encéphalite, des vésicules d'herpès au niveau de la lèvre supérieure.

En résumé, le virus herpétique, introduit dans l'organisme, se propage de proche en proche, à la faveur des voies préformées, et laisse des traces matérielles dans sa marche envahissante, à partir du point d'inoculation. Les nerfs et surtout les

(1) DOERR et SCHNABEL. *Revue générale d'ophtalmologie*, p. 281, 1920, *Klin. Monatsbl. für Augenheilk.*, 1920, *Zeitschr. für Hyg.*, p. 29, 1921.

centres nerveux, ces derniers en raison de leur riche vascularisation, offrent des lésions considérables, dont l'intensité dépend du degré de la virulence et de la durée de la maladie. Cette propagation du virus herpétique à travers les espaces lymphatiques des nerfs et des parois des vaisseaux se fait à la faveur de la névrite ascendante et constitue un type des plus démonstratifs de cette affection dont l'existence a donné naissance à des discussions intéressantes. De cette manière, l'étude systématique des lésions nerveuses dans l'herpès expérimental constitue une nouvelle contribution au problème de la névrite ascendante et, pour le lecteur désireux d'être renseigné à cet égard, nous renvoyons au travail de l'un de nous (1).

(1) G. MARINESCO, Recherches sur les lésions du système nerveux central dans le typhus exanthématique. Ces *Annales*, mars 1921.

SUR LA CONTAGION DE LA TUBERCULOSE DE COBAYE A COBAYE DANS LES LABORATOIRES ET LES ÉLEVAGES

ERRATA A UN ARTICLE DE REMLINGER

(juillet 1923),

Passage à intercaler après le premier alinéa de la page 706 (...crachat inoculé).

OBSERVATION XXVII. — M. J..., 33 ans, entrepreneur, a joui d'une excellente santé jusqu'à une pneumonie survenue il y a dix-sept mois. Celle-ci lui a laissé de la dyspnée et une expectoration abondante jaune verdâtre pour lesquelles il a consulté de nombreux médecins. Aucun d'eux n'a porté le diagnostic de tuberculose. Jamais le bacille de Koch n'a été rencontré dans les crachats et la radiographie a toujours été négative également. Le 20 avril 1921, M. J... nous est adressé en vue d'un nouvel examen de l'expectoration. L'analyse n'ayant mis en évidence qu'un très petit nombre d'espèces microbiennes banales, une inoculation est pratiquée sous la peau de l'abdomen de deux cobayes. Les jours et les semaines qui suivent, aucune lésion n'est observée au point d'inoculation et la région inguinale ne montre aucun ganglion, de sorte que, pressé par le médecin traitant, nous croyons pouvoir lui adresser, au commencement de juin, une réponse définitivement négative. Le 17 du même mois, on note que l'un des deux animaux présente une légère parésie du train postérieur. Elle augmente les jours suivants et le malade traîne après lui, comme un poids mort, son arrière-train souillé d'urines et de matières fécales. Mort le 21. A l'autopsie il n'existe pas la moindre lésion au point d'inoculation et les ganglions inguinaux ne présentent pas la moindre augmentation de volume. Aucune hypertrophie des ganglions bronchiques. Les poumons et le foie sont normaux. La rate est environ triplée de volume, mais ne montre aucune autre lésion macroscopique. Dans le mésentère, on rencontre des ganglions hypertrophiés dont le volume varie de celui d'un grain de millet à celui d'une lentille et dont l'aspect est très suspect. La moelle lombaire est congestionnée et ramollie. Aucune autre particularité. Deux cobayes reçoivent sous la peau une émulsion de la rate hypertrophiée et succombent à une tuberculose expérimentale classique, l'un le 24 août, l'autre le 20 octobre. Deux autres cobayes reçoivent de même une émulsion de ganglions mésentériques et succombent semblablement à la tuberculose, l'un le 20 août, l'autre le 6 octobre. La nature tuberculeuse des lésions observées ne fait aussi aucun doute.

Page 700, ligne 24. Au lieu de : et de donneurs de matières en particulier, il faut lire : et des donneurs de matières.

✓ Page 707, ligne 17. *Au lieu de* : Il survient presque fatalement dans les Instituts auxquels est annexé un élevage où retournent parfois des animaux déjà utilisés pour diverses expériences, *il faut lire* : Il survient fatalement dans les Instituts auxquels est annexé un élevage *que* retournent parfois à celui-ci des animaux déjà utilisés pour diverses expériences.

✓ Page 704, lignes 30-35. *Il faut lire* : Le 12 avril 1922, 12 lapins neufs sont mis dans un même box de 3 mètres de long sur 2 m. 50 de large avec un cobaye tuberculeux; afin de favoriser la souillure des aliments par l'urine et les matières fécales, ils reçoivent pour toute nourriture de l'orge déposée à terre..., etc.

Le Gérant : G. MASSON.

